Aus der Medizinischen Klinik, Abteilung IV,
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Eggstein

ÄTHANOL UND HÖHERE ALKOHOLE IM URIN VON DIABETIKERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Hans-Joachim Bülow
aus Bremen

1980

Aus der Medizinischen Klinik, Abteilung IV,
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Eggstein

ÄTHANOL UND HÖHERE ALKOHOLE IM URIN VON DIABETIKERN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Hans-Joachim Bülow
aus Bremen

1980

Dekan: Professor Dr. G. Rassner
Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Schmülling
(Professor Dr. M. Eggstein)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

Mein herzlicher Dank gilt

meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. M. Eggstein
für die Überlassung des Themas,

Herrn Oberassistent Dr. H. M. Liebich für seine
Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen
und der Abfassung der Arbeit,

Herrn Oberassistent Dr. R. Maulbetsch aus der
Abteilung für Datenverarbeitung der Medizinischen
Universitätsklinik Tübingen für seine Hilfe bei
der Durchführung der statistischen Berechnungen
und

Herrn J. Wöll für seine Fürsorge für die technischen
Einrichtungen und besonders für seine stete Hilfs-
bereitschaft bei der Lösung technischer Probleme.

Inhaltsverzeichnis: Seite

A. Einleitung: 1

B. Zielsetzung: 2

C. Methoden:

1. Apparative Ausstattung 4
1.1. Gaschromatograph 4
1.2. Kopplung zwischen GC und Massenspektrometer 4
1.3. Massenspektrometer 6
1.4. Kompensationsschreiber 6

2. Geräteparameter für die Massenfragmentographie 6
2.1. Gaschromatograph 6
2.2. Massenspektrometer 6
2.3. Kompensationsschreiber 7

3. Vorbereitung und Wartung des Gerätes für die MF 7
3.1. Inbetriebnahme des Gaschromatographen 7
3.2. Einfahren der Schubstange in den Ionenquellenraum 7
3.3. Inbetriebnahme des Massenspektrometers 7
3.4. Empfindlichkeitseinstellung 8
3.5. Ausheizen bei zu schlechtem Untergrund 8

4. Chemikalien 8
4.1. Standardsubstanzen 8
4.2. Extraktionsmittel 9
4.3. Reinigungsmittel 9

5. Interne Standards 9
5.1. Prinzip 9
5.2. Ansetzen der Lösungen für den internen Standard 10
5.3. Reinheit der verwendeten Standards 11

Seite

6. Das Analyseverfahren 11
6.1. Äthanolbestimmung 11
6.2. Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin 12

7. Chromatogramme 14
7.1. Registrierung der Chromatogramme 14
7.2. Beschreibung der Chromatogramme 14

8. Erstellung der Eichkurven 17
8.1. Grobe Ermittlung der Empfindlichkeit des Verfahrens 17
8.2. Äthanoleichkurve 17
8.3. Eichkurve für die Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin 20
8.4. Auswertefaktoren für die einzelnen Alkohole 23

9. Auswertung 23
9.1. Ausmessung der Massenfragmentogramme 23
9.2. Quotient Alkohol/Standard Q, korrigierter Quotient 25
9.3. Berechnung der Alkoholkonzentration im Urin und der Ausscheidungsmenge/24 h 25
9.4. Exemplarisches Beispiel für die Auswertung eines Massenfragmentogramms 26

10. Präzisionsbestimmung 28

11. Nachweisgrenzen 29

12. Spezifität des Verfahrens und Interferenzen 29

13. Herkunft und Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials 30

14. Untersuchungen im Routinelabor 31

15. Klinische Daten 31

16. Heptanon-4-Bestimmung 31

Seite

D. Ergebnisse:

1. Allgemeine Angaben zur Auswertung 32
1.1. Umfang des Datenmaterials 32
1.2. Einteilung der Diabetiker in Gruppen 32
1.3. Statistische Auswertung 33
1.4. Normierung der 24-Std.-Urinmenge auf 1600 mg Kreatinin/d 35

2. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse 36
2.1. Ergebnisse der Auswertung für die einzelnen Alkohole 36
2.2. Ergebnisse von den Diabetikergruppen aus betrachtet 39
2.3. Zusammenhänge mit anderen Parametern 41
2.4. Heptanon-4-Bestimmung 42

E. Zusammenfassung: 44

F. Tabellen und Histogramme:

Äthanol 46
Propanol 49
Isobutanol 52
Butanol 55
Isoamylalkohol 58
Zusammenfassende Übersichtstabellen 61

G. Literaturverzeichnis: 63/64

A. EINLEITUNG:

Um das quantitative Verhalten der Alkohole im Serum und Urin bei Diabetikern beurteilen zu können, bedarf es einer viel genaueren Methode als zum Beispiel der herkömmlichen enzymatischen Bestimmung des Äthanol im Serum mit der Alkoholdehydrogenase. Hiermit ist eine quantitative Bestimmung nur bis zu einer Konzentration von etwa 50 mg/l möglich, was zur Bestimmung von exogen zugeführtem Alkohol ausreichend ist. Dagegen betragen die endogen entstandenen Serumäthanolspiegel ca. 5 mg/l, die Spiegel der übrigen Alkohole (Propanol, Isobutanol, Butanol, Isoamylalkohol) liegen sogar nur im µg-Bereich, so daß man für die Beantwortung der vorliegenden Fragestellung eine bis um den Faktor 1000 empfindlichere Methode benötigt.

Rein gaschromatographische Bestimmungen niederer Alkohole exogenen Ursprungs wurden schon in den Jahren 1964 (9) und 1965 (10) durchgeführt, wobei Äthanol bis zu einer Konzentration von 1 - 2 mg/100 ml nachgewiesen werden konnte. Für die Bestimmung der endogenen Konzentrationen von Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol ist diese Nachweisgrenze ebenfalls noch nicht ausreichend.

Hierfür bietet sich die Methode der Massenspektrometrie in ihrer Kombination mit der Gaschromatographie an, die von Sweeley et al. 1968 eingeführt und für die Bestimmung von Chlorpromazinspiegeln im Serum verwendet wurde (12). Sie zeichnet sich durch höchste Empfindlichkeit, verbunden mit ausgegezeichneter Spezifität, aus und erlaubt, selbst in geringster Konzentration vorkommende Stoffe in biologischen Materialien zu identifizieren und zu quantifizieren. Mit Hilfe der direkten Massenfragmentographie, das heißt der Registrierung eines charakteristischen Ions (single ion detection, SID) oder einiger weniger charakteristischer Ionen (multiple ion detection, MID) werden Stoffe spezifisch und empfindlich bis in den fg-Bereich hinein nachgewiesen (5).

Voraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist, daß die zu bestimmenden Komponenten leicht flüchtig sind oder durch Derivatisierung in flüchtige Substanzklassen überführt werden können. Am leichtesten zugänglich sind niedermolekulare Substanzklassen wie Carbonsäuren, Aminosäuren, Ketone, Alkohole, biogene Amine und Steroide (5). Darüber hinaus können aber auch höher und hochmolekulare Stoffe, teilweise nach vorheriger Spaltung, analysiert werden. Es trifft dies zu für Prostaglandine, Lipide, Oligosaccharide und Peptide.

Am besten lassen sich genaue quantitative Bestimmungen unter Verwendung von internen Standards durchführen. Als interne Standards kommen Substanzen mit ähnlichen chemischen Eigenschaften wie die zu bestimmenden Komponenten, Isomere und Homologe, in Frage (5).

In den letzten Jahren ist es mit dieser Methode gelungen, abnorm hohe Konzentrationen der aliphatischen Alkohole Äthanol, Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol und der Ketone Heptanon-4 und Cyclohexanon im Urin bei Diabetikern nachzuweisen (6). Weitere, eingehendere Untersuchungen ergaben, daß die H-4-Bildung abhängig von der Schwere der diabetischen Stoffwechsellage und bei juvenilen Diabetikern am höchsten ist. Gleichzeitig nahm die biologische Streuung mit der Schwere der Erkrankung zu. Bisher ist für keine der Substanzen ein Stoffwechselweg bekannt (3, 7).

B. ZIELSETZUNG:

In der vorliegenden Arbeit sollen die bei Diabetikern pathologisch erhöht gefundenen Äthanol-, Propanol-, Isobutanol-, Butanol- und Isoamylalkohol-Konzentrationen im Urin in Beziehung gesetzt werden zur Schwere der diabetischen Stoffwechselsituation. Das Patientengut wurde hierzu eingeteilt in stoffwechselgesunde Patienten und der Schwere des Diabetes mellitus nach geordnet in diätetisch einstellbare, oral einstellbare, insulinpflichtige und juvenile Diabetiker.

Innerhalb dieser Gruppen sollen die Konzentrationen der verschiedenen Alkohole miteinander verglichen und eventuelle signifikante Unterschiede ermittelt werden.

Dabei sollen zusätzlich verschiedene Stoffwechselparameter, die die Ausprägung der diabetischen Stoffwechselsituation kennzeichnen, berücksichtigt werden. Darunter fallen das BZ-Tagesprofil, Urinzucker, Aceton um Urin und Cholesterin, Triglyceride, Kreatinin und Harnstoff im Serum. Ferner wurden berücksichtigt das Übergewicht und allgemein anerkannte diabetogene Folgeerkrankungen wie spezifisch diabetische Gefäßveränderungen, diabetische Nephropathie (Glomerulosklerose und Pyelonephritis) und Polyneuropathie.

Um einen unmittelbaren Vergleich zwischen dem Verhalten des Heptanon-4 und der aliphatischen Alkohole innerhalb der einzelnen Diabetikergruppen zu erhalten, wurde das H-4 nach der von G. Huesgen 1978 beschriebenen Methode nochmals bestimmt (3, 7).

Bis heute sind die den Krankheitsverlauf bestimmenden Komplikationen, zum Beispiel die Polyneuropathie bei Diabetes mellitus und bei der akuten Porphyrie in ihrem Wesen unerkannt, während die klinischen Symptome längst feststehen (5). Vielleicht kann diese Arbeit einen Schritt dazu beitragen, neue Stoffwechseldefekte anhand charakteristischer, biochemisch faßbarer Kardinalsymptome aufzuklären. Nur so wird es möglich sein, einen Einblick in die Ätiologie dieser Komplikationen zu bekommen.

C. METHODEN

1. Apparative Ausstattung:

1.1. Gaschromatograph:

1.1.1. Propanol-, Isobutanol-, Butanol-, Isoamylalkoholbest.:

Für die Auftrennung der flüchtigen Bestandteile der Proben wird ein Gaschromatograph (GC) - Modell 2700 - der Firma VARIAN MAT GmbH/Bremen verwendet.

Die Auftrennung der injizierten Substanzmenge erfolgt in einer mit Emulphor ON-870 belegten Kapillarsäule aus Edelstahl mit 100 m Länge und einem inneren Durchmesser von 0,5 mm.

Zur Einbringung der Substanzmenge in die Säule ist ein Injektorblock vorgeschaltet, der das System durch ein Septum aus Silikongummi luftdicht verschließt und durch Aufheizung auf ca. 260 ^{o}C die Probe verdampft und mit dem eingeleiteten Helium-Trägergas vermischt.

1.1.2. Äthanolbestimmung:

Im Falle der Äthanolbestimmung wird, um das Wasser vor dem Eintritt in das Massenspektrometer abzufangen, ein T-Stück mit zwei Ventilen zwischen das Ende der Säule und der Platinkapillare, die zur Überleitung der aufgetrennten Substanzen in das Massenspektrometer dient, geschaltet. Die zwei Ventile mit der T-Verbindung haben gegenüber einer denkbaren 3-Wege-Verbindung den Vorteil eines geringeren Totvolumens (8).

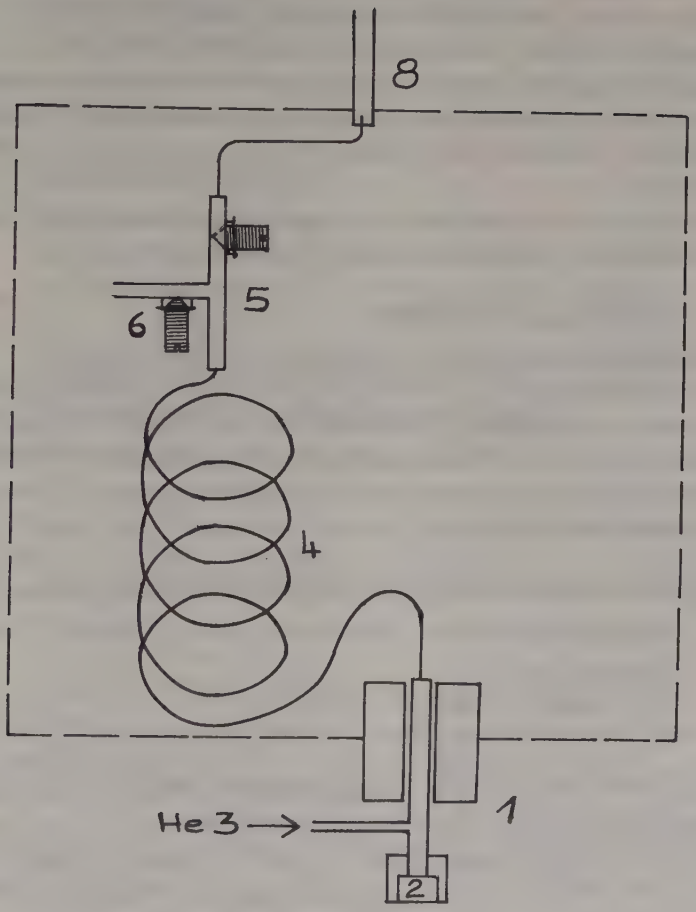
Abb. 1 zeigt schematisch den GC und die Anordnung der Säule und der Ventile für die Äthanolbestimmung.

1.2. Kopplung zwischen GC und Massenspektrometer:

Als Kopplungsteil dient eine Platinkapillare mit 30 cm Länge und einem inneren Durchmesser von 0,1 mm, die zum luftdichten Abschluß gegenüber dem Massenspektrometer in eine Schubstange eingelassen ist. Auf diese Weise wird der Druckunterschied zwischen GC und MS überbrückt.

Abb.: 1

Schema: Gaschromatograph



1 Injektorblock
2 Septum
3 He-Gaszufuhr
4 Gaschromatographiesäule
5 T-Verbindungsstück
6 Ventile für den H2O-Dampf-Auslaß
7
8 Überleitung in das MS

1.3. Massenspektrometer:

Als Massenspektrometer (MS) wird das CH-5-Massenspektrometer der Firma VARIAN MAT GmbH/Bremen verwendet. Die Ionenquelle ist mit einer Hochleistungsdiffusionspumpe (Pumpenleistung 600 l/sec) ausgerüstet und ermöglicht zusammen mit der Überleitung durch die beschriebene Platinkapillare das direkte Einleiten des gesamten Säulendurchflusses in die Ionenquelle.

Als Detektionssystem bei der Massenfragmentographie dient der Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) des MS.

1.4. Kompensationsschreiber:

Die Massenfragmentogramme werden mit einem 2-Kanal-Kompensationsschreiber - Modell 56 - der Firma PERKIN-ELMER Überlingen registriert. Je nach Stärke des vom SEV kommenden Signals ist bei diesem Gerät eine Meßbereichsschaltung möglich, die eine Variation des Vollausschlagsignals von 1 mV - 1000 mV erlaubt.

2. Geräteparameter für die Massenfragmentographie (MF):

2.1. Gaschromatograph:

Ofentemperatur:	65 °C
Injektorblocktemperatur:	260 °C
Durchfluß der Säule:	ca. 8 ml He/sec

Alle Parameter sind bei der Äthanolbestimmung und der Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin gleich.

Bei der Bestimmung des Äthanols im Urin mittels Direkteinspritzung des Urins ist jedoch zusätzlich zur Ableitung des Wasserdampfes aus der GC-Säule das unter 1.1.2. beschriebene Ventilsystem notwendig.

2.2. Massenspektrometer:

Elektronenenergie der Ionenquelle	70 eV
Emissionsstrom der Ionenquelle	300 uA
Beschleunigungsspannung	3 kV
Spannung des SEV	2 - 3 kV
Ionenquellentemperatur	220 °C
Interfacetemperatur	230 °C

Auflösung	400
Arbeitsdruck	8×10^{-5} Torr
Verstärkereinstellung	0,02 BDF
Masseneinstellung m/e	31

Alle Parameter sind bei der Äthanolbestimmung und der Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin gleich.

2.3. Kompensationsschreiber:

Meßbereichsschaltung	5 - 1000 mV
Papiervorschub	5 mm/min
Nullpunkteinstellung	wird vor jeder Messung korrigiert

3. Vorbereitung und Wartung des Gerätes für die MF:

3.1. Inbetriebnahme des Gaschromatographen:

Die Ofentemperatur wird konstant auf 65 °C und der Gasfluß auf ca. 8 ml/sec eingestellt. Der Säulendurchfluß wird zunächst über die Vorvakuumpumpe am Ausgang der Überleitungskapillare in das MS abgesaugt bis nach ca. 10 - 15 min die Luft aus der Säule verdrängt ist. Danach kann die Schubstange in den Ionenquellenraum eingefahren werden.

3.2. Einfahren der Schubstange in den Ionenquellenraum:

Nach Öffnen des Ventils zum Ionenquellenraum wird die Schubstange langsam unter Kontrolle des Arbeitsdruckes eingefahren. Dabei darf der Arbeitsdruck nicht über 10^{-4} Torr ansteigen, da sonst die Ionenquelle aus Sicherheitsgründen abschaltet und abkühlt. Vergleichbare Messungen sind aber nur bei gleicher Ionenquellentemperatur möglich.

3.3. Inbetriebnahme des Massenspektrometers:

Nach Stabilisierung des Arbeitsdrucks wird der Emissionsstrom der Ionenquelle auf die notwendigen 300 µA erhöht, der SEV eingeschaltet und der Magnetstromregler auf das untersuchte Fragment m/e 31 eingestellt. Sodann wird nach Einlaß einer Referenzsubstanz der Masse 31 (Methanol) der Ionenstrahl genau fokussiert und so das Ausgangssignal optimiert.

3.4. Empfindlichkeitseinstellung:

Sobald sich auf dem Kompensationsschreiber eine konstante Nullinie abzeichnet, wird unter Einspritzung eines Standardleerwertes (enthält nur den internen Standard) die Empfindlichkeit auf die gewünschte Höhe eingestellt. Die Empfindlichkeit erwies sich als ausreichend, wenn bei einer Meßbereichsstellung des Kompensationsschreibers von 10 mV bei der Äthanolbestimmung und von 5 mV bei der Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin der Ausschlag des Standardsignals circa die Hälfte des Vollausschlages beträgt.

3.5. Ausheizen bei zu schlechtem Untergrund:

Hebt sich der Standardpeak nach der Empfindlichkeitseinstellung ungenügend vom Untergrund ab, so daß ein genaues Ausmessen unmöglich wird, muß die GC-Säule mindestens eine halbe Stunde bei 150 °C ausgeheizt werden. Ist danach das "Rauschen" immer noch zu hoch, ist ein nochmaliger Versuch des Ausheizens der GC-Säule angezeigt. Führt dieser nicht zum Erfolg, muß auch die Ionenquelle ausgeheizt werden. Hierzu wird die Ionenquelle für ca. 3 Std. auf 110 °C erwärmt. Danach werden die Peaks ausnahmslos gut trennbar vom Untergrund registriert und können exakt ausgemessen werden.

4. Chemikalien:

4.1. Standardsubstanzen:

4.1.1. Interne Standards:

a) Äthanolbestimmung:
- Diäthyläther, pro Analysi, MERCK 921
mind. 99,5 %

b) für die Bestimmung der übrigen Alkohole
- Krotylalkohol, zur Synthese, MERCK 802654
mind. 97 %

4.1.2. Alkoholstandards für die Erstellung der Eichkurven:

- Äthanol, pro Analysi, MERCK 972, mind. 99,8 %
- Propanol-1, pro Analysi, MERCK 998, mind. 99,5 %
- Isobutanol, pro Analysi, MERCK 984, mind. 99 %

- Butanol-1, pro Analysi, MERCK 1990, mind. 99,5 %
- Isoamylalkohol, pro Analysi, MERCK 979, mind. 99 %

4.2. Extraktionsmittel:

- Dichlormethan bidest, pro Analysi, MERCK 6050, mind. 99,5 %

Das verwendete Dichlormethan wird zusätzlich folgendermaßen aufgearbeitet:

1500 ml Dichlormethan werden mit 150 ml konzentrierter Schwefelsäure kräftig geschüttelt und einen Tag in den Kühlraum gestellt. Danach wird es nochmals kräftig geschüttelt und die Schwefelsäure aus dem Schütteltrichter ausgelassen. Das mit Schwefelsäure gereinigte Dichlormethan wird mit 75 ml in NaOH und dann noch zweimal mit 100 ml Aqua bidest. gewaschen. Anschließend wird das Dichlormethan über Natriumsulfat gefiltert und destilliert.

4.3. Reinigungsmittel:

- Aceton: pro Analysi, MERCK 14, mind. 99,5 %

5. Interne Standards:

5.1. Prinzip:

Eine quantitative massenspektrometrische Analyse ohne internen Standard ist sehr schwierig. So ist zum Beispiel für jede der zu bestimmenden Komponenten eine Eichung der Empfindlichkeit des MS mittels einer Reinsubstanz notwendig. Die Meßbedingungen müssen streng konstant gehalten werden, so daß sich die relativen Intensitäten der Peaks im Massenspektrum nicht von Messung zu Messung ändern (1). Diesen Schwierigkeiten geht man aus dem Weg, wenn man die Probe mit einem internen Standard versetzt. Man verwendet dazu Stoffe mit ähnlichen chemischen Eigenschaften wie die zu bestimmende Komponente, Isomere und Homologe, die in der GC-Auftrennung eine unterschiedliche aber vergleichbare Retentionszeit und das gleiche Fragmention in der Massenspektrometrie haben (5).

Die gesuchte Menge der zu bestimmenden Komponente erhält man dann aus deren rel. Peakhöhe im Verhältnis zum internen Standardpeak über eine Eichkurve. Da der interne Standard bei jeder Probe mitgeführt wird, sind die Störmöglichkeiten durch Veränderung der Meßbedingungen ausgeschaltet und eine absolute Eichung der Empfindlichkeit des MS für die entsprechende Komponente überflüssig geworden.

5.2. Ansetzen der Lösungen für den internen Standard:

5.2.1. Diäthylätherstandard für die Äthanolbestimmung:

In einem auf 100 ml geeichten Glaskolben mit Schliffverschluß werden 50 µl Diäthyläther (s. 4.1.1.) mit etwas destilliertem Wasser vermischt. Nach kräftigem Schütteln wird auf 100 ml aufgefüllt. Sodann wird nochmals gründlich gemischt. Durch dieses Vorgehen wird der reine Diäthyläther bei der Zugabe in den Kolben sofort verdünnt und ein eventuelles Abdampfen verhindert.

Eine weitere Vorsichtsmaßnahme gegen eine Verringerung der Diäthylätherkonzentration in der Standardlösung ist die Lagerung derselben bei 4 °C im Kühlschrank während des ganzen Versuchstages und das täglich neue Ansetzen des Standards.

Vergleichsmessungen haben gezeigt, daß sich die Standardlösung auf diese Weise während des Versuchstages in ihrer Konzentration nicht verändert.

5.2.2. Krotylalkoholstandard für die Bestimmung der übr. Alk.:

Es werden mit dem unter 5.2.1. angegebenen Verfahren unter Zugabe von 25 µl Krotylalkohol 100 ml Standard hergestellt. Gegen eventuelle Veränderungen des Standards werden die gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie beim Diäthylätherstand ergriffen.

Da der reine Krotylalkohol ein ungesättigtes aliphatisches C-Atomgerüst besitzt, muß eine chemische Reaktion der Doppelbindung - zum Beispiel Oxydation - durch kühle Lagerung, Schutz vor Licht und durch baldiges Aufbrauchen verhindert werden.

Auch beim Krotylalkohol wurde durch Vergleichsmessungen eine Veränderung des Standards während des Versuchstages ausgeschlossen.

5.3. Reinheit der verwendeten Standards:

Auch die verwendeten hochgereinigten Produkte enthalten die entsprechenden Standardsubstanzen nur zu 98,8 %. Die restlichen 1,2 % könnten auch die zu bestimmenden Komponenten enthalten.

Um den hierdurch entstehenden Fehler zu vermeiden, wird an jedem Analysentag eine Aqua-bidest-Probe, die nur mit dem internen Standard versetzt wird, als Standardleerwert mitgeführt. Die so gemessenen Verunreinigungen können dann später von den ermittelten Analysewerten subtrahiert werden.

6. Das Analyseverfahren:

6.1. Äthanolbestimmung:

6.1.1. Problematik bei Direkteinspritzung von wässrigen Lösungen:

Bei der Äthanolbestimmung wird der Urin nur mit internem Standard versetzt und direkt eingespritzt. Das bringt den Vorteil mit sich, daß die Proben vor der Analyse nicht aufbereitet werden müssen. Der Nachteil der Direkteinspritzung besteht im allgemeinen darin, daß auch das Wasser in das MS gelangt und die Empfindlichkeit des Systems durch Schädigung der Elektroden schon nach wenigen Analysen rapide absinkt. Dieser große Nachteil wird jedoch durch die Zwischenschaltung des unter 1.1.2. beschriebenen T-Stücks mit den beiden Ventilen vollständig vermieden, wenn man sofort nach Erscheinen des Äthanolpeaks den Wasserdampf in den Ofenraum des GC ableitet (8).

Ein weiterer Nachteil der direkten Einspritzung von wässrigen Lösungen ist, daß sich die wasserlöslichen, nicht flüchtigen Bestandteile bei der Verdampfung im Injektorblock niederschlagen und die Rückstände nach ca. 50 Einspritzungen entfernt werden müssen.

Eine grobe Verschmutzung der GC-Säule war jedoch während der ganzen Versuchsreihe nicht festzustellen. War durch einen zu schlechten Untergrund bei der MF ein Ausmessen der Peaks nicht mehr möglich, so genügte das Ausheizen der Säule.

6.1.2. Aufbereitung der Proben für die Äthanolbestimmung:

Zu einer 1 ml-Probe Urin werden mit einer Mikroliterspritze 4 µl Diäthyläther-standard pipettiert. Danach wird die Probe in einem Schliffglasröhrchen zwei Minuten lang geschüttelt.

6.1.3. Durchführung der Äthanol-Analyse:

Es wird jeweils 1 µl, der wie beschrieben aufbereiteten Proben, mit einer Mikrolitherspritze in den Injektorblock eingespritzt. Es ist immer darauf zu achten, daß die Injektion gleichmäßig und mit der selben Geschwindigkeit erfolgt, sonst kann es zur Ausbildung von Doppelpeaks kommen, die schlecht auszuwerten sind.

6.2. Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin:

6.2.1. Allgemeines zum Extraktionsverfahren:

Bei der Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin müssen die Proben extrahiert werden. Eine Direkteinspritzung ist nicht möglich, da man den Propanolpeak gaschromatographisch nicht vom Wasserdampf trennen kann.

Als Extraktionsmittel muß ein organisches Lösungsmittel verwendet werden, welches eine kürzere Retentionszeit als die zu bestimmenden Komponenten hat und sich nicht mit diesen überschneidet. Es muß in höchstem Reinheitsgrad vorliegen und sollte die zu bestimmenden flüchtigen Substanzen, wenn überhaupt, nur in geringsten Mengen enthalten. Bei der Bestimmung von primären Alkoholen ist darüber hinaus vom Extraktionsmittel zu fordern, daß es nicht das gleiche Fragmention M/e 31 bildet. Ferner muß das verwendete Lösungsmittel gut verträglich für die Ionenquelle sein, das heißt es darf die Ionenquelle zum Beispiel nicht oxydieren oder auf andere Weise chemisch angreifen, was die Empfindlichkeit des MS erheblich einschränken würde. Diesen Anforderungen genügt das verwendete Dichlormethan am besten.

Bei der Extraktion selbst ist darauf zu achten, daß sie so lange durchgeführt wird, bis das Verteilungsgleichgewicht nach NERNST für alle der zu extrahierenden Komponenten erreicht ist. Für die zu bestimmenden Alkohole und den Krotylalkoholstandard hat sich bei kräftigem Ausschütteln eine Extraktionszeit von zwei Minuten empirisch als ausreichend erwiesen.

Quantitativ unterschiedliche Verteilungsgleichgewichte der einzelnen zu extrahierenden Komponenten spielen keine Rolle, da bei Erstellung der Eichkurven für jeden der zu bestimmenden Alkohole eine Verdünnungsreihe in Aqua bidest. angesetzt und die so gewonnenen Proben ebenso wie die Urinproben aufbereitet und analysiert werden. Würde man die Verdünnungsreihe direkt in Dichlormethan ansetzen, so müßte man die unterschiedlichen Verteilungsgleichgewichte der einzelnen Alkohole bei der Auswertung mit einberechnen.

6.2.2. Aufbereitung der Proben:

Zu einer 1 ml-Probe Urin in einem Glasröhrchen mit Schliffverschluß werden mit einer Mikroliterspritze 4 µl Krotylalkoholstandard gegeben und zwei Minuten lang geschüttelt. Danach wird 1 ml Dichlormethan zugegeben und zwei Minuten durch kräftiges Schütteln extrahiert. Haben sich die beiden Phasen getrennt, wird der wässrige Überstand abgesaugt und der Extrakt in ein Nisselröhrchen gegeben. Unter Abblasen mit Stickstoff wird die Probe auf ein Zehntel eingeengt.

6.2.3. Durchführung der Analyse:

Die Durchführung entspricht dem unter 6.1.3. bei der Äthanolanalyse angegebenen Verfahren, indem das eingeengte Extrakt eingespritzt wird.

6.2.4. Überlappende Chromatographie:

Bei der überlappenden Chromatographie wird schon die nächste Probe in die GC-Säule eingegeben, bevor die Analyse der vorhergehenden abgeschlossen ist. Bei der Äthanolbestimmung ist dieses Verfahren nicht möglich, da nach jeder Bestimmung das Wasser aus der Säule abgelassen werden muß.

Bei der praktischen Anwendung dieses Verfahrens ist darauf zu achten, daß die nächste Probe nicht zu früh eingespritzt wird, da sonst der Isoamylalkoholpeak durch das Erscheinen des Lösungsmittels der nächsten Probe verschluckt werden könnte. Bewährt hat sich die Einspritzung der nächsten Probe bei Erscheinen des Krotylalkoholstandards der vorhergehenden. Zwischen dem Isoamylalkohol und dem Erscheinen des Lösungsmittels besteht dann ein sicheres Intervall von circa zwei Minuten.

7. Chromatogramme:

7.1. Registrierung der Chromatogramme:

Mittels des Meßbereichsschalters des Kompensationsschreibers wird der Meßbereich so eingestellt, daß jeweils die Höhe des Fragmentpeaks vollständig registriert wird. Es ist zusätzlich darauf zu achten, daß die Basislinie des Chromatogramms ständig in Höhe der Nullinie des Schreibers verläuft, damit sich bei einer notwendigen Änderung des Meßbereichs der Fußpunkt des Peaks nicht ändert. Man erspart sich auf diese Weise, kontinuierlich Marken für die Basislinie bei den entsprechenden Meßbereichen setzen zu müssen.

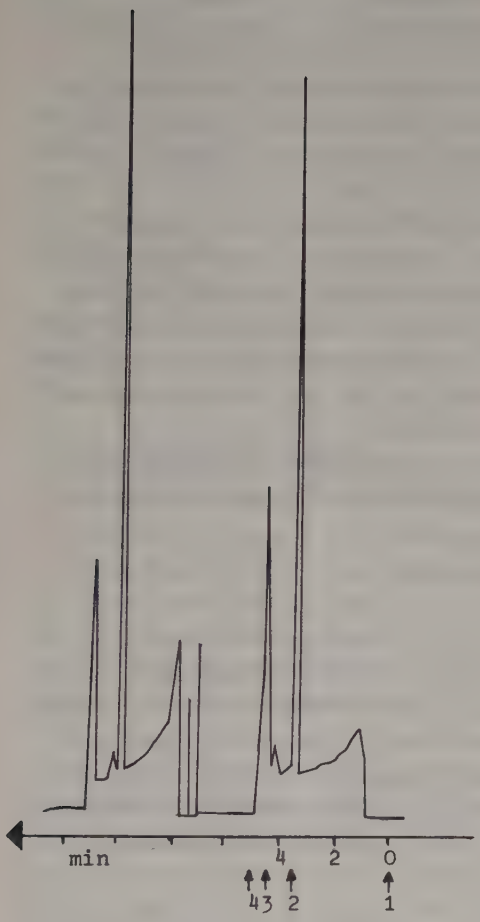
7.2. Beschreibung der Chromatogramme:

7.2.1. Äthanolbestimmung:

Der Diäthyläther-Standard-Peak erscheint 3 - 4 Minuten nach Einspritzung auf dem Kompensationsschreiber, der Äthanol-Peak 1 - 1,5 Minuten später. Nach Erscheinen des Äthanol-Peaks werden die Ventile sofort für die Wasserableitung umgeschaltet. Die Wasserableitung dauert ca. 3 - 4 Minuten.

Die ganze Analyse beansprucht also eine Zeit zwischen 7 und 10 Minuten. Siehe Abb. 2.

Die angegebenen Retentionszeiten können jedoch nur als Anhaltspunkte dienen, denn sie sind in hohem Maße von der nicht genau einzustellenden Gasdurchflußgeschwindigkeit der GC-Säule abhängig. Im Zweifelsfalle muß man sich bei der Identifikation eines Peaks nach der relativen Retentionszeit der entsprechenden Substanz im Verhältnis zum internen Standard richten, welche immer konstant ist.



1 ≙ Injektion
2 ≙ Diäthylätherstandard
3 ≙ Äthanol
4 ≙ Ablassen des Wasserdampfes aus der GC-Säule

Abb. 2:

Exemplarische Darstellung eines Chromatogramms für die Äthanolbestimmung.

In besonderem Maße gilt dies für die Bestimmung der Alkohole Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol, die alle zusammen in einer Probe bestimmt werden.

7.2.2. Bestimmung der übrigen Alkohole im Urin:

Nach der Injektion gelangt zunächst das Lösungsmittel Dichlormethan in die Ionenquelle. Oft ist der Einstrom des Lösungsmittels so brüsk, und das Vakuum im Ionenquellenraum sinkt so stark ab (über 10^{-4} Torr), daß die Ionenquelle aus Sicherheitsgründen für ein paar Sekunden automatisch abgeschaltet wird.

Zur Identifikation der Propanol-, Isobutanol-, Butanol-, Krotylalkoholstandard- und Isoamylalkohol-Peaks wurden hoch verdünnte Standardlösungen der entsprechenden Substanzen ebenso wie die Urinproben aufbereitet und zur Bestimmung der exakten Retentionszeiten einzeln eingespritzt. Danach war die Reihenfolge des Erscheinens der einzelnen Alkohole eindeutig geklärt.

Zwischen der Injektion und dem Erscheinen des Lösungsmittels besteht ein Intervall von ca. 4 min. Kurz nach dem Lösungsmittel erscheint gerade noch davon abgesetzt der Propanolpeak (ca. 6 min nach Injektion). Als nächstes folgt der Isobutanol- (nach ca. 7 min), der Butanol- (nach ca. 9 min), der Krotylalkoholstandard- (nach ca. 12 min) und zuletzt der Isoamylalkohol-Peak (nach ca. 14 min).

Ein exemplarisches Massenfragmentogramm der quantitativen Analyse der übrigen Alkohole im Urin ist in Abb. 3 dargestellt.

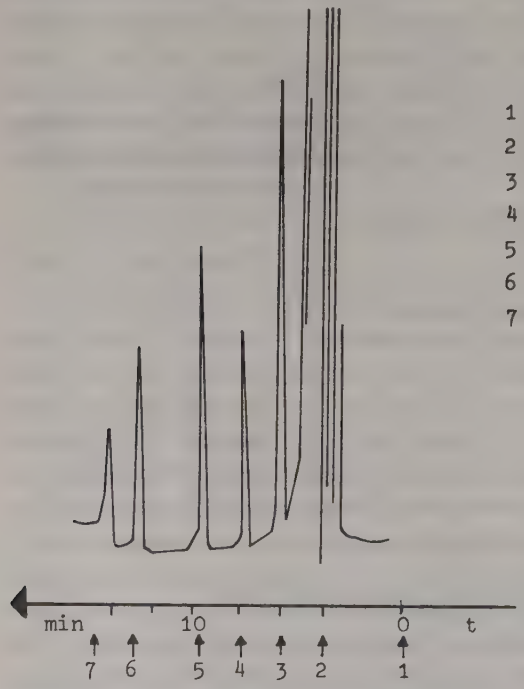


Abb. 3:

Exemplarische Darstellung eines Massenfragmentogramms für die quantitative Analyse der übrigen Alkohole im Urin.

8. Erstellung der Eichkurven:

8.1. Grobe Ermittlung der Empfindlichkeit des Verfahrens:

Für die Erstellung der Eichkurven wurden zunächst verschieden gering konzentrierte Meßlösungen eingespritzt und die Empfindlichkeit des Verfahrens orientierend ermittelt. Davon ausgehend wurde eine Stammlösung erstellt und die Meßlösungen so angesetzt, daß der gesamte bei den Probanden vorkommende Konzentrationsbereich abgedeckt wird.

Da die Alkohole Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol im Urin in einer einzigen Analyse bestimmt werden können, wurden sie auch zusammen in einer einzigen Stammlösung angesetzt.

8.2. Äthanoleichkurve:

8.2.1. Meßlösungen für die Äthanoleichkurve:

Zunächst wird eine Äthanolstammlösung hergestellt. Hierzu füllt man einen 1-Liter-Meßkolben zu 1/3 mit aqua bidest. und pipettiert 500 µl Äthanol (s. 4.1.2.) hinzu und mischt sofort gründlich. Dann erst wird auf einen Liter aufgefüllt. Auf diese Weise ist gewährleistet, daß das hochprozentige Äthanol nicht zu einem kleinen Teil verdunsten kann.

Ausgehend von dieser Stammlösung werden in 25 ml-Meßkolben sechs verschieden konzentrierte Meßlösungen angesetzt. Die einzelnen Konzentrationen der Meßlösungen sind in Tabelle eins dargestellt.

Lsg. Nr.	µl Stamm-Lsg. auf 25 ml Aqu.bidest.	entspricht	nl/ml	entspricht	mg/l
1	10	"	0,2	"	0,16
2	50	"	1	"	0,79
3	100	"	2	"	1,58
4	500	"	10	"	7,90
5	2000	"	40	"	31,60
6	5000	"	100	"	79,00

Tabelle 1:

Meßlösungen für die Ermittlung der Äthanoleichkurve.

8.2.2. Ermittlung der Äthanoleichkurve:

Ausgehend von den Äthanol-Meßlösungen wird jeweils eine 1-ml-Probe, wie unter 6.1.2., aufbereitet und analysiert. Für jede Meßlösung wird eine Dreifachbestimmung und für Lösung 3 und 4 zur Präzisionsbestimmung eine Fünffachbestimmung durchgeführt. Der Meßwert wird durch Ermittlung der relativen Peakhöhe Äthanol/Diäthylätherstandard erhalten und mit Q bezeichnet. Die arithmetischen Mittelwerte dieser Messungen $\bar{Q}$ gehen in die Eichkurve ein.

Die Meßwerte für die Äthanoleichkurve sind in Tabelle 2 dargestellt.

Lsg.-Nr.	Meßwerte Q	Mittelwerte $\bar{Q}$
1	0,043 0,044 0,042	0,043
2	0,190 0,150 0,180	0,170
3	0,400 0,376 0,360 0,320 0,380	0,367
4	1,820 1,796 1,688 1,653 1,710	1,730
5	7,3 8,2 7,3	7,6
6	18,7 18,1 17,2	18,0

Tabelle 2:
Meßwerte für die Äthanoleichkurve

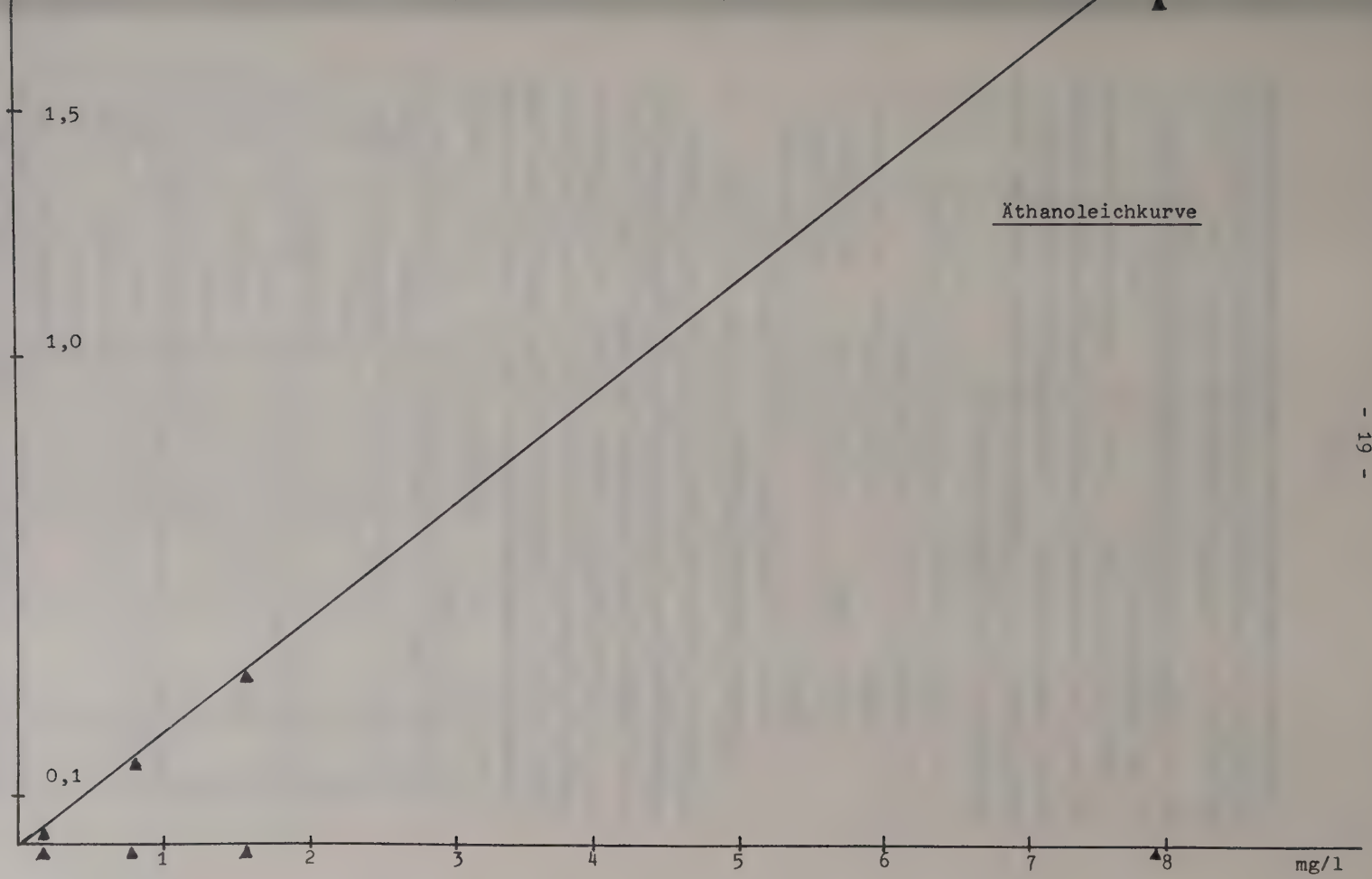


Abb. 4:

Aus den angegebenen Werten wurde die Regressionsgerade ermittelt und die erhaltene Gerade als Eichkurve verwendet. In Abb. 4 ist die Äthanoleichkurve dargestellt.

8.3. Eichkurve für die Bestimmung der übrigen Alkohole:

8.3.1. Meßlösungen:

Zunächst wird mit den unter 4.1.2. angegebenen Reagenzien für alle übrigen Alkohole gemeinsam eine Stammlösung angesetzt. Hierzu werden die in Tab. 3 angegebenen Volumina unter Verwendung des in 8.2.1. angegebenen Verfahrens in einem 1-Liter-Meßkolben mit Aqua bidest angesetzt.

Propanol	100 µl/1 Liter	Aqua bidest
Isobutanol	100 µl/1 Liter	" "
Butanol	40 µl/1 Liter	" "
Isoamylalkohol	100 µl/1 Liter	" "

Tabelle 3:
Ansatz der Stammlösung für die Eichkurve der übrigen Alkohole im Urin.

Ausgehend von dieser Stammlösung werden in einem 100 ml-Meßkolben 400 µl der Stammlösung mit Aqua bidest angesetzt. Die entstandene Lösung entspricht der Meßlösung Nr. 1. Alle weiteren Meßlösungen erhält man entsprechend wie in Tabelle 4 angegeben:

Lsg. Nr.	µl Stammlösung auf 100 ml Aqua bidest	entspricht		µg/l
1	400		Propanol	320
			Isobutanol	320
			Butanol	130
			Isoamylalkohol	324
2	300		Propanol	240
			Isobutanol	240
			Butanol	97,5
			Isoamylalkohol	243
3	200		Propanol	160
			Isobutanol	160
			Butanol	65
			Isoamylalkohol	162

Lsg. Nr.	µl Stammlösung auf 100 ml Aqua bidest	entspricht		µg/l
4	100		Propanol	80
			Isobutanol	80
			Butanol	32,5
			Isoamylalkohol	81
5	50		Propanol	40
			Isobutanol	40
			Butanol	16,25
			Isoamylalkohol	40,5

Tabelle 4:
Meßlösungen für die Ermittlung der Eichkurve der übrigen Alkohole im Urin.

8.3.2. Ermittlung der Eichkurve für die übrigen Alkohole:

Ausgehend von den in Tab. 4 angegebenen Meßlösungen wird jeweils eine 1-ml-Probe, wie unter 6.2.2., aufbereitet und analysiert. Für jede Meßlösung wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Meßwerte werden durch Ermittlung der relativen Peakhöhen Alkohol/Krotylalkoholstandard erhalten und mit Q bezeichnet. Die arithmetischen Mittelwerte dieser Messungen $\bar{Q}$ gehen in die Eichkurven ein. Die entsprechenden Meßwerte sind aus Tab. 5 zu ersehen.

Lsg. Nr.	Alkohol	Meßwerte Q	Mittelwerte $\bar{Q}$
1	Propanol	3,45	3,8
		4,15	
	Isobutanol	1,9	1,8
		1,7	
	Butanol	1,1	1,13
		1,16	
	Isoamylalkohol	1,1	1,05
		1,0	

Lsg. Nr.	Alkohol	Meßwerte Q	Mittelwerte $\bar{Q}$
2	Propanol	2,96 2,92	2,94
	Isobutanol	1,5 1,35	1,425
	Butanol	0,74 0,8	0,77
	Isoamylalkohol	0,7 0,79	0,745
3	Propanol	1,8 2,05	1,925
	Isobutanol	0,98 0,9	0,94
	Butanol	0,54 0,53	0,535
	Isoamylalkohol	0,5 0,43	0,465
4	Propanol	1,01 0,7	0,855
	Isobutanol	0,6 0,38	0,49
	Butanol	0,4 0,23	0,315
	Isoamylalkohol	0,2 0,18	0,19
5	Propanol	0,49 0,6	0,545
	Isobutanol	0,28 0,23	0,255
	Butanol	0,15 0,12	0,135
	Isoamylalkohol	0,13 0,073	0,1

Tabelle 5:

Meßwerte für die Eichkurve der übrigen Alkohole im Urin.

Aus den angegebenen Werten werden die Regressionsgeraden ermittelt und die erhaltenen Geraden als Eichkurve verwendet. In Abb. 5 sind die Eichkurven für die Alkohole Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol dargestellt. Die in die Eichkurven eingegangenen Meßwerte sind schon von dem Fehler, der durch Verunreinigungen des Extraktionsmittels zustande kommen könnte, durch das in 5.2.3. und in 9.1. angegebene Verfahren bereinigt.

8.4. Auswertefaktoren für die einzelnen Alkohole:

Der reziproke Wert der Steigung der jeweiligen Eichgerade ist der Auswertefaktor f. Er beträgt für die einzelnen Alkohole die in Tabelle 6 angegebenen Zahlenwerte.

Alkohol	Auswertefaktor f
Äthanol	4,3
Propanol	83
Isobutanol	163
Butanol	120
Isoamylalkohol	320

Tabelle 6:
Auswertefaktoren für alle Alkohole im Urin.

9. Auswertung:

9.1. Ausmessung der Massenfragmentogramme:

Erster Schritt bei der Auswertung ist die Ausmessung der Höhe der Peaks. Dabei fällt man vom Bandengipfel auf die Zeitachse das Lot und verbindet die beiden Bandenfußpunkte.

Die Strecke Bandengipfel-Verbindungslinie der Bandenfußpunkte wird auf 1 mm genau ausgemessen. Bei Flankenpeaks muß man eine entsprechende Tangente als Basis wählen.

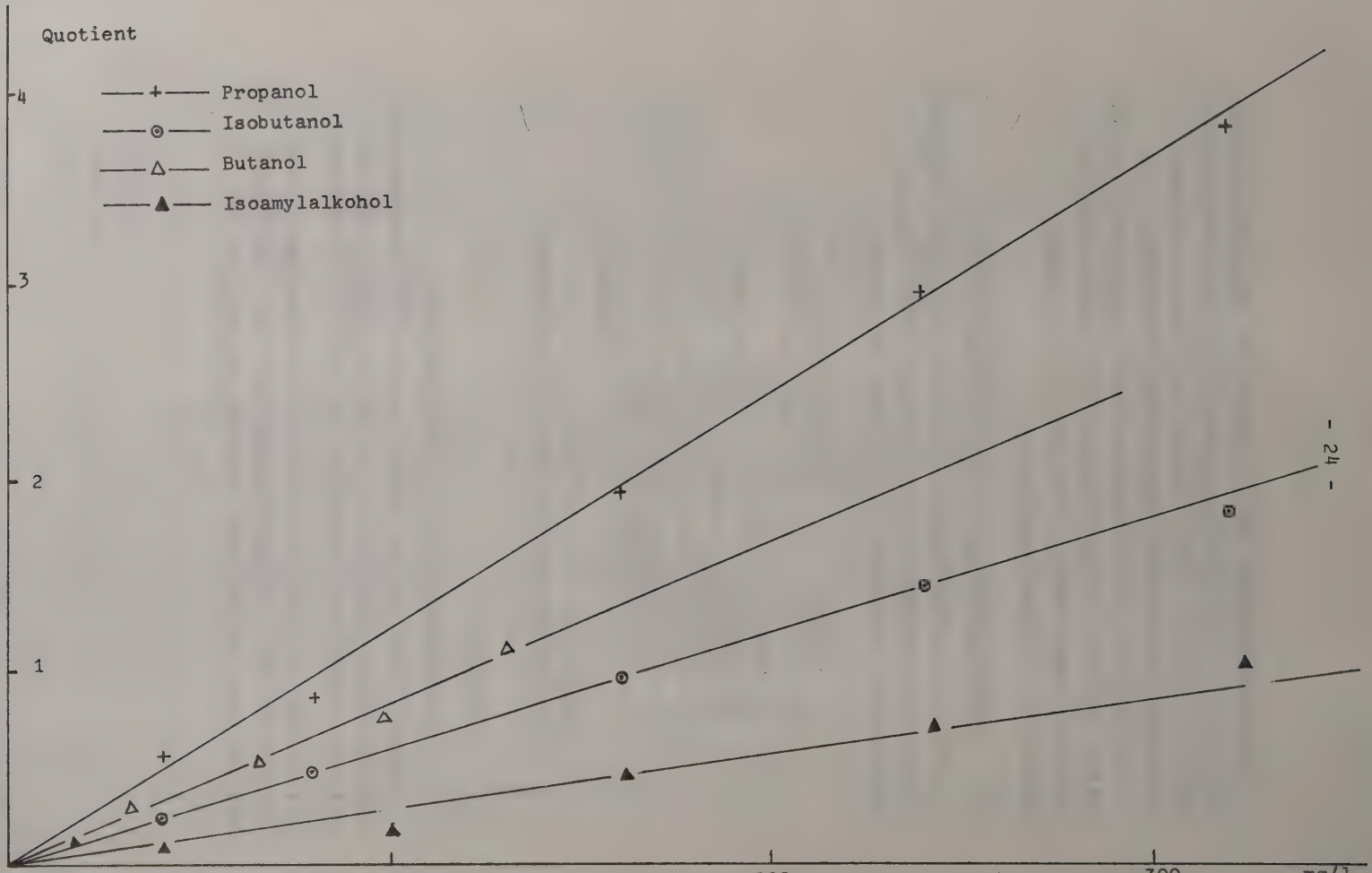

Quotient
Propanol
Isobutanol
Butanol
Isoamylalkohol
4
3
2
1
100
200
300
mg/l

Abb. 5:

9.2. Quotient Alkohol/Standard Q, korrigierter Quotient:

Als nächster Schritt wird die relative Signalhöhe des entsprechenden Alkohols in bezug zum Standard ermittelt, indem man den Quotienten Alkohol/Standard berechnet. Hierbei ist, wenn Alkohol- und Standardpeak mit verschiedenen Meßbereichseinstellungen am Kompensationsschreiber registriert wurden, ein entsprechender Dämpfungsfaktor zu berücksichtigen.

Um Verunreinigungen des internen Standards und des Extraktionsmittels mit zu erfassen, wird an jedem Versuchstag ein Standardleerwert mitgeführt, der bei der Äthanolbestimmung nur destilliertes Wasser und Diäthylätherstandard und bei der Bestimmung der übrigen Alkohole destilliertes Wasser mit Krotylalkoholstandard - ausgeschüttelt mit 1 ml Dichlormethan - enthält. Die entsprechenden Quotienten Alkohol/Standard werden jetzt mit k bezeichnet und von Q des gleichen Versuchstages subtrahiert.

9.3. Berechnung der Alkoholkonzentration im Urin und der Ausscheidungsmenge/24 h:

Durch Multiplikation von Q abzüglich k mit dem Auswertefaktor f erhält man die Konzentration des entsprechenden Alkohols im Urin.

Durch nochmalige Multiplikation mit der Urinmenge U erhält man die entsprechende Ausscheidungsmenge/24 h des Alkohols.

$$A = (Q - k) \times f \times U$$

mit A = Alk.-Menge/24 h
Q = Alk./Stand. der Probe
k = Alk./Stand. des Stand.-Leerwertes
f = Auswertefaktor
U = Urinmenge/24 h

9.4. Exemplarisches Beispiel für die Auswertung eines Massenfragmentogramms:

Abb. 6 zeigt ein Massenfragmentogramm der übrigen Alkohole im Urin, daneben das des Standardleerwertes vom selben Versuchstag. Es ergeben sich die in Tab. 7 angegebenen Quotienten Q für die Probe und k für den Standardleerwert.

Alkohol	Massenfragmentogramm Urinprobe $Q = \frac{X - OH}{Standard}$	Massenfragmentogramm Standardleerwert $k = \frac{X - OH}{Standard}$
Propanol	2,21	0,09
Isobutanol	0,97	0,05
Butanol	1,47	0,15
Isoamylalkohol	0,53	0,06

Tabelle 7:
Quotienten Q und k aus Massenfragmentogrammen der Abb. 5.

Nimmt man eine Urinmenge U von 1880 ml an, so erhält man unter Zugrundelegung der in 9.3. angegebenen Formel die in Tab. 8 angegebenen Alkoholmengen/24 h.

Alkohol	Q - k	f	(Q - k) x f µg/l	Q x f x U mit U = 1,880 l µg/l
Propanol	2,12	83	176	331
Isobutanol	0,92	163	150	282
Butanol	1,32	120	158	298
Isoamylalkohol	0,47	320	150	283

Tabelle 8:
Alkoholmengen/24 h, die sich aus dem Massenfragmentogramm in Abb. 6 unter Berücksichtigung des Standardleerwertes vom selben Versuchstage ergeben.

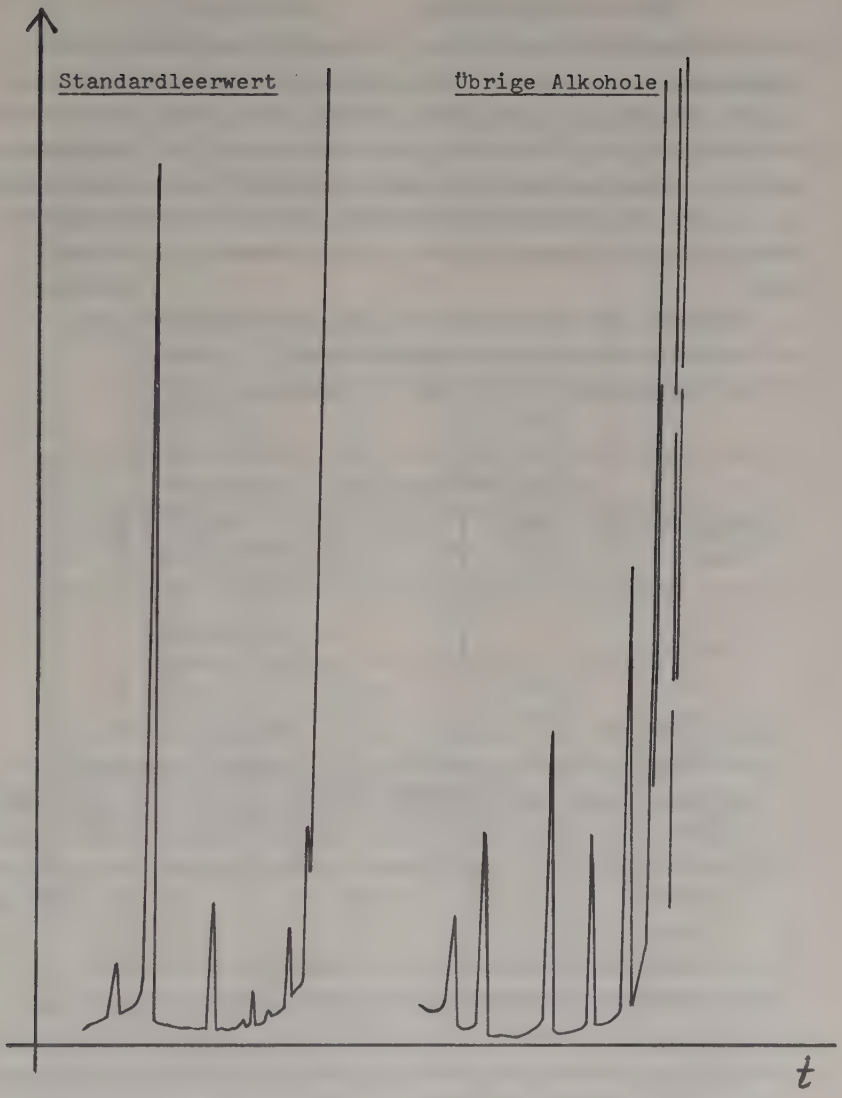


Abb. 6:

Exemplarisches Beispiel eines Massenfragmentogramms der übrigen Alkohole im Urin mit Standardleerwert vom selben Versuchstage.

10. Präzisionsbestimmung:

Eine Präzisionsbestimmung, in der das massenfragmentographische Verfahren auf Eignung hinsichtlich seiner Genauigkeit untersucht werden soll, wurde durch Fünffachbestimmung der Meßlösung Nr. 3 und Nr. 4 bei Erstellung der Äthanoleichkurve durchgeführt. Die entsprechenden Meßlösungen wurden hierzu für jede Bestimmung einzeln aus der Stammlösung angesetzt, so daß ein eventueller Pipettierfehler miterfaßt wird.

Es wurden die Mittelwerte $\bar{X}$, die Standardabweichung s und der Variationskoeffizient VK berechnet.

Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt.

Meßlösung Nr. 3			
Meßwerte Q	Mittelwert $\bar{Q}$	Stand.-Abw. S	Variations-K. VK
0,4 0,376 0,36 0,32 0,38	0,367	0,03	8,1 %
Meßlösung Nr. 4			
1,82 1,796 1,688 1,653 1,71	1,73	0,07	4,1 %

Tabelle 8

Bei beiden untersuchten Konzentrationen liegt der Variationskoeffizient unter 10 %, bei Lsg.-Nr. 4 sogar unter 5 %. Dem massenfragmentographischen Verfahren darf also hinsichtlich seiner Präzision eine gute Eignung zugesprochen werden.

11. Nachweisgrenzen:

Die Nachweisgrenzen wurden über eine Verdünnungsreihe beim Erstellen der Eichkurven ermittelt. Limitierende Faktoren für die Nachweisgrenze sind in erster Linie Alkoholverunreinigungen der internen Standards und des Extraktionsmittels und nicht die Empfindlichkeit des Analyseverfahrens, welches noch den Nachweis geringerer Substanzmengen gestattet.

Empirisch ergaben sich die in Tab. 9 angegebenen Nachweisgrenzen.

Alkohol	Nachweisgrenze
Äthanol	0,16 mg/l
Propanol	5 µg/l
Isobutanol	5 µg/l
Butanol	5 µg/l
Isoamylalkohol	10 µg/l

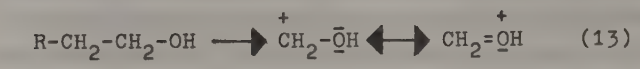
Tabelle 9:
Nachweisgrenzen der einzelnen Alkohole

Beim Analysieren der Patientenproben ist der Untergrund durch Verunreinigungen bedingt etwas schlechter als beim Erstellen der Eichkurven, so daß sich die Nachweisgrenze noch etwas in höhere Konzentrationsbereiche verschieben dürfte. Die Nachweisgrenze verschiebt sich jedoch höchstens um 20 %.

12. Spezifität des Verfahrens und Interferenzen:

Es werden zur Erfassung ein und derselben Substanz zwei Verfahren in Kombination verwendet, 1. die gaschromatographische Auftrennung und 2. die Massenspektrometrie mit Intensitätsbestimmung der entsprechenden Fragmentionen. Um eine Interferenz mit anderen Substanzen, die nicht bestimmt werden sollen, zu erhalten, müßten diese die gleiche Retentionszeit bei der GC haben und dann noch bei der MS in der Ionenquelle das gleiche Fragmention bilden.

Die Bildung des Fragmentions geschieht bei den primären Alkoholen durch Spaltung der zur OH-Gruppe gehörigen C-C-Bindung:



(13)

Dieses Fragmention der primären Alkohole hat die Masse m/e = 31. Andere Substanzen, die dasselbe Fragmention oder ein anderes Fragmention der Masse m/e = 31 bilden, sind zum Beispiel Ketone wie Aceton, Butanon, Pentanon, Pentenon, Hexanon, Heptanon-2 und Heptanon-4. Ferner haben Äther und Essigsäuremethylester einen m/e=31-Peak.

Interferenzen mit den angeführten Substanzen sind jedoch nicht zu erwarten, da erstens die Retentionszeiten dieser Substanzen von denjenigen der zu bestimmenden Alkohole verschieden sind und zweitens die entsprechenden m/e-31-Peaks nur bis maximal 5 % der entsprechenden Maximalpeaks betragen und sehr hohe Konzentrationen vorhanden sein müßten, um eine Störung zu verursachen. Solche Konzentrationen wurden jedoch noch nie beobachtet.

13. Herkunft und Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials:

Die Urinproben werden als 24 h-Sammelurine während des Klinikaufenthaltes der Patienten erhalten. Die Patienten werden darauf hingewiesen, zwei Tage vor und während der Sammelperiode keinen Alkohol zu genießen. Sammelperiode dauert 3 Tage.

Wird während einer Sammelperiode weniger als 300 oder mehr als 3000 ml erhalten, so bleibt dieses Intervall unberücksichtigt.

Es werden von jeder Sammelperiode 3 x 10 ml Urin in Kunststoffröhrchen bei -18 °C eingefroren und bis zur Analyse aufbewahrt. Lagerzeiten von über zwei Monaten werden vermieden. Innerhalb dieses Zeitraums verändern sich die Proben nachweislich nicht (11).

Eine der drei aufbewahrten Urinproben pro Patient und Sammelperiode dient zur Bestimmung des Äthanol, eine zur Bestimmung der übrigen Alkohole und die dritte zur Bestimmung des H-4 im Urin.

14. Untersuchungen im Routinelabor:

Sofort nach Ende der Sammelperiode wird Glucose und Kreatinin quantitativ bestimmt.

Proteingehalt und Aceton werden semiquantitativ mit Teststäbchen ermittelt.

An zwei Tagen der dreitägigen Sammelperiode wird ein Blutzucker-Tagesprofil bestimmt.

Darüber hinaus wird im Isotopenlabor der Insulinspiegel und das C-Peptid ermittelt.

15. Klinische Daten:

Aus den Krankenblättern werden nachträglich die in Tab. 11 angegebenen Parameter erfaßt.

- Alter, Geschlecht
- Größe, Gewicht
- Art und Dauer des Diabetes
- Kalorienzufuhr in g KH/d
- Diabetesmedikamente: Insulin, orale Antidiabetika
- diabetische Komplikationen
- zusätzliche Medikamente
- alle weiteren Diagnosen
- Serumharnstoff, -Cholesterin, -Triglyceride

Tabelle 11:
Patientenparameter aus dem Krankenblatt

16. Heptanon-4-Bestimmung:

Um das Verhalten der Alkohole im Urin bei Diabetikern mit demjenigen des H-4 exakt vergleichen zu können, wird das H-4 zusätzlich bestimmt.

Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine massenfragmentographische Bestimmung, die nach der von G. Huesgen 1978 beschriebenen Methode durchgeführt wird (3, 7).

D. ERGEBNISSE:

1. Allgemeine Angaben zur Auswertung:

1.1. Umfang des Datenmaterials:

In der vorliegenden Arbeit wurden 237 Urinproben von Diabetikern und 62 von Nichtdiabetikern auf Äthanol, Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol analysiert. Dabei fielen überschlagsmäßig 1500 Meßwerte an, die es zu beurteilen galt.

Hinzu kommen die Daten aus den Krankenblättern und die Untersuchungen aus dem Routinelabor, die unter Punkt 14 und 15 im Methodikteil schon erwähnt wurden.

1.2. Einteilung der Diabetiker in Gruppen:

Um die Alkoholausscheidung in Abhängigkeit von der Schwere der diabetischen Stoffwechselsituation beurteilen zu können, wurden die Diabetiker, wie in der Klinik allgemein üblich, in folgende Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: Insulinpflichtige, das heißt nur mit parenteralen Insulingaben einzustellende Diabetiker.

Gruppe II: Oral einstellbare, das heißt mit oralen Antidiabetika einzustellende Diabetiker.

Gruppe III: Diätetische, das heißt mit Diät einzustellende Diabetiker.

Gruppe IV: Juvenile, das heißt Diabetiker, die von Jugend an eine inkretorische Pankreasinsuffizienz haben. Es handelt sich hierbei um einen labilen Insulinmangeldiabetes, der durch häufig raschen Übergang in eine komplette beta-Zellinsuffizienz mit ausgeprägter Ketoseneigung ausgezeichnet ist (2).

Gruppe V: In dieser Gruppe wurden die Gruppen I - IV zusammengefaßt.

Die angegebenen Patientengruppen wurden jeweils mit einer Gruppe von stoffwechselgesunden Patienten verglichen.

An diese sogenannten "Normalpatienten" wurde weiterhin die Forderung gestellt, daß sie weder eine subklinische diabetische Stoffwechsellage (Glucosebelastungstest) noch irgendeine andere Stoffwechselerkrankung hatten. Ferner mußten sie eine normale Nierenfunktion haben, das heißt die Retentionswerte wie Serumkreatinin und Serumharnstoff mußten im Normbereich liegen, und der Urinbefund mußte unauffällig sein. Damit kann eine Nierenerkrankung nahezu ausgeschlossen werden (2).

1.3. Statistische Auswertung:

1.3.1. Ausreißertest nach NALIMOV:

Um die Ausscheidungswerte der einzelnen Alkohole als homogen interpretieren zu können, wurde ein Ausreißertest nach NALIMOV vorgenommen.

Man benötigt hierzu eine Meßdatenanzahl $n > 3$, die Standardabweichung s und den Mittelwert der Meßwerte n. R wird aus folgender Formel berechnet:

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

Es ist kein Ausreißer feststellbar, wenn $r^* < r$ ist. r ist hierzu für den entsprechenden Freiheitsgrad $f = n - 2$ aus einer r-Tabelle zu entnehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde r(99) gewählt, das heißt ein Ausreißer wird mit einer Wahrscheinlichkeit von P = 99 % eliminiert.

Wird auf diese Weise ein Ausreißer ermittelt und eliminiert, muß das Datenmaterial erneut auf Ausreißer untersucht werden. Der Test wird so lange durchgeführt, bis ein Ausreißer nicht mehr feststellbar ist.

Der NALIMOV-Ausreißertest ist sehr scharf, in der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb einer Gruppe oft so viele Werte eliminiert, daß nur noch negative Ergebnisse übrig blieben. Eine statistische Auswertung ist jedoch nur für eine homogene Verteilung der Meßergebnisse möglich (4).

1.3.2. t-Test zur Ermittlung signifikanter Unterschiede:

Nach der Durchführung des NALIMOV-Tests stellen die Ausscheidungswerte der verschiedenen Alkohole im Urin innerhalb der einzelnen Diabetikergruppen Zufallsvariablen dar, die normalverteilt sind. Unter dieser Voraussetzung ist es erlaubt, die Unterschiedlichkeit zweier Verteilungen mittels eines t-Tests zu beurteilen. Hierbei wird objektiv entschieden, ob sich die Mittelwerte $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ voneinander unterscheiden.

Zu berechnen ist die Prüfgröße TAU, welche mit den vom Freiheitsgrad $f = n_1+n_2-2$ abhängigen t-Faktoren (t-Tabelle) zu vergleichen ist:

$$TAU = \left| \frac{x_1 - x_2}{s_d} \right| \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Entscheid:

TAU ist mit t(95), t(99) und t(99,9) für $f = n_1 + n_2 - 2$ zu vergleichen:

TAU kleiner t(95): Ein Unterschied zwischen $\bar{x}_1$ und $\bar{x}_2$ ist nicht feststellbar.

TAU größer oder gleich t(95), jedoch kleiner als t(99):
$\bar{x}_1$ unterscheidet sich wahrscheinlich von $\bar{x}_2$.

TAU größer oder gleich t(99), jedoch kleiner als t(99,9):
$\bar{x}_1$ unterscheidet sich signifikant von $\bar{x}_2$.

TAU größer oder gleich t(99,9):
$\bar{x}_1$ unterscheidet sich hochsignifikant von $\bar{x}_2$.

Die Termini "nicht feststellbar, wahrscheinlich, signifikant und hochsignifikant" werden im weiteren wie angegeben verwendet.

1.3.3. Meßbereichskorrektur anhand der Verteilung der Meßdaten:

Sind statistisch keine Unterschiede in der Ausscheidung der einzelnen Alkohole im Urin zwischen den Diabetikergruppen und den "Normalpatienten" zu ermitteln, so wurden anhand der aufgestellten Verteilungen grob der Meßbereich korrigiert, so daß augenfällige Ausreißer eliminiert wurden, und die so zu ermittelnden Mittelwerte in einem Histogramm verglichen. Die so gewonnenen Ergebnisse sind jedoch statistisch nicht zu beweisen.

Abb. 7 zeigt exemplarisch die Verteilung von Äthanol für diätetisch eingestellte Diabetiker und verdeutlicht die grobe Bereichskorrektur.

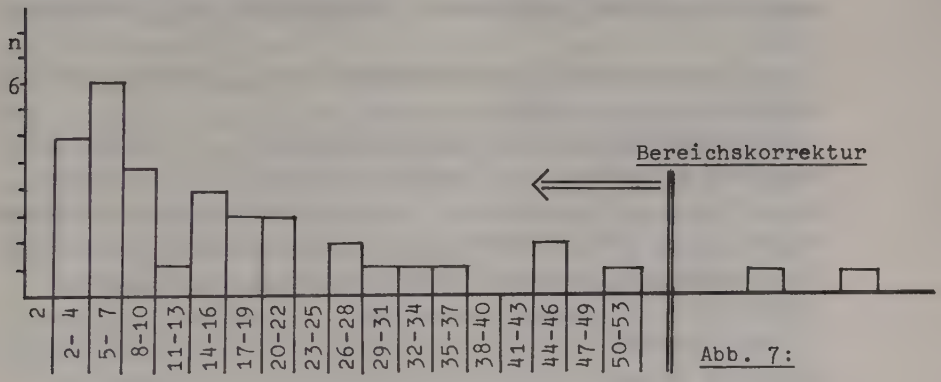


Abb. 7:

1.4. Normierung der 24-Std.-Urinmenge auf 1600 mg Kreatinin/d:

Bei Sammeln des 24-Std.-Urins hat sich gezeigt, daß die Urinmengen bei den einzelnen Patienten von Tag zu Tag starken Schwankungen unterworfen waren, die nur durch unkorrektes Sammeln zustandekommen können. Auch mehrmalige Aufforderungen, doch korrekt zu sammeln, führten kaum zum Erfolg.

Um den hierdurch entstehenden Fehler zu verringern, wurde die gesammelte Urinmenge auf eine Kreatininausscheidung von 1600 mg/d normiert. Es wurde folgende Formel angewendet:

$$U = \frac{1600}{x} \cdot u$$

mit U = normierte Urinmenge in ml
x = Kreatinin/d in mg
u = gesammelte Urinmenge in ml

Da die Kreatininbildung abhängig von der Muskelmasse ist, wird sich auf diese Weise ebenfalls ein Fehler ergeben. Dieser ist jedoch unvergleichbar geringer als derjenige, der sich durch unkorrektes Sammeln ergeben hat.

2. Auswertung und Darstellung der Ergebnisse:

2.1. Ergebnisse der Auswertung für die einzelnen Alkohole:

2.1.1. Äthanol:

Fast alle Probanden (80 - 98 %), gleich welcher Diabetikergruppe sie angehören, scheiden Äthanol im Urin aus.

Die Äthanolausscheidung in mg/d bewegt sich in einem Bereich von 1 - 700 mg, es kommen jedoch Höchstwerte bis über 6 g/d vor, die wohl auf exogene Äthanolzufuhr zurückzuführen sind.

Nach Anwendung des Ausreißertestes nach NALIMOV ergaben sich Mittelwerte von 2 - 6 mg/d.

Die Ausscheidung der juvenilen Diabetiker ($\bar{x}$ = 6,15) ist gegenüber derjenigen der "Normalpatienten" ($\bar{x}$ = 3,1) wahrscheinlich (P = 95 %) erhöht. Für insulinpflichtige Diabetiker zeichnet sich nach Durchführung des Ausreißertestes ebenfalls eine Erhöhung ab, sie läßt sich statistisch jedoch nicht objektivieren.

Die Ergebnisse sind in Tab. 12 und 13 sowie in Abb. 8 zur Übersicht dargestellt (S. 46, 47 und 48).

2.1.2. Propanol:

Ein Anteil von 38 - 63 % der Probanden aller Gruppen scheidet Propanol im Urin aus.

Die Propanolausscheidung in ug/d bewegt sich in einem Bereich von 1 - 300 µg, es kommen jedoch Höchstwerte bis 2400 ug/d vor. Nach Durchführung des Ausreißertestes nach NALIMOV ergaben sich Mittelwerte von 0 - 34,2 µg/d. Sie waren bei den insulinpflichtigen Diabetikern am höchsten mit $\bar{x}$ = 34,2 gefolgt von den diätetischen Diabetikern mit $\bar{x}$ = 5,4. Die übrigen Gruppen wiesen nach Herstellung der Homogenität des Datenmaterials nur noch negative Ergebnisse auf.

Die Ausscheidung der insulinpflichtigen Diabetiker ($\bar{x}$ = 34,2) ist gegenüber derjenigen der Normalpatienten ($\bar{x}$ = 0) statistisch hochsignifikant (P = 99,9 %) erhöht.

Die Ausscheidung in der Gruppe der diätetisch einstellbaren Diabetiker ($\bar{x}$ = 5,4) ist gegenüber den Normalpatienten signifikant erhöht.

Für die juvenilen Diabetiker kann man eine erhöhte Ausscheidung nicht statistisch objektivieren. Anhand des Histogramms läßt sich jedoch nach Meßbereichskorrektur (1 - 300 µg) mittels Verteilungskurve eine erhöhte Ausscheidung vermuten. Gleiches gilt für die oral eingestellten Diabetiker.

Die Ergebnisse sind in Tab. 14 und 15 sowie in Abb. 9 zur Übersicht dargestellt (S. 49, 50 und 51).

2.1.3. Isobutanol:

Der Anteil der Probanden, der überhaupt Isobutanol ausscheidet liegt bei höchstens 10,5 %. Normalpatienten scheiden zu 0 % Isobutanol aus.

Nach Durchführung des Ausreißertestes nach NALIMOV bleiben nur noch negative Ergebnisse bei der Auswertung übrig. Nach Korrektur des Meßbereichs mittels Verteilungskurve bewegen sich die Mittelwerte zwischen 2,2 und 3,3 µg/d. Diätetische scheiden im Mittel ($\bar{x}$ = 3,3) vor den juvenilen ($\bar{x}$ = 2,7) und insulinpflichtigen Diabetikern ($\bar{x}$ = 2,2) am meisten aus.

Die Ergebnisse sind in Tab. 16 und 17 sowie in Abb. 10 zur Übersicht dargestellt (S. 52, 53 und 54).

2.1.4. Butanol:

Der Anteil derjenigen Probanden, die Butanol im Urin ausscheiden schwankt bei den Diabetikern zwischen 42 und 18 %. Normalpatienten scheiden nur zu 3,2 % Butanol im Urin aus.

Die Ausscheidungsmengen/d liegen zwischen 7 und 294 µg/d bei den Diabetikern, dagegen konnte man bei den Normalpatienten überhaupt nur bei zwei Butanol im Urin nachweisen, wobei die Mengen unter 30 µg/d betrugen.

Nach Durchführung des Ausreißertestes nach NALIMOV zeigen nur noch die insulinpflichtigen Diabetiker ein positives Ausscheidungsergebnis. Die Ausscheidung der insulinpflichtigen Diabetiker ist damit hochsignifikant (P = 99,9 %) gegenüber allen anderen Patientengruppen einschließlich Normalpatienten erhöht. Der Mittelwert $\bar{x}$ beträgt dabei 8,7 µg/d.

Nach überschlagsmäßiger Bereichskorrektur anhand der Verteilung ergibt sich für alle Diabetikergruppen eine gegenüber den Normalpatienten erhöhte Tagesausscheidung.

Die Ergebnisse sind in Tab. 18 und 19 sowie in Abb. 11 zur Übersicht dargestellt (S. 55, 56 und 57).

2.1.5. Isoamylalkohol:

8 - 29 % aller Probanden scheiden Isoamylalkohol aus, Diabetiker zu einem Anteil zwischen 16 und 29 %.

Nach Durchführung des Ausreißertestes nach NALIMOV bleiben nur noch negative Ergebnisse bei der Auswertung übrig. Nach Korrektur des Meßbereichs anhand der Verteilung des Datenmaterials bewegen sich die Mittelwerte $\bar{x}$ zwischen 1,7 (Normalpatienten) und 12,5 µg/d (Insulinpflichtige). Auch die anderen Diabetikergruppen zeigen nach der Bereichskorrektur erhöhte Ausscheidungswerte. Die diätetisch und oral einstellbaren Diabetiker liegen mit ca. 6 µg/d noch vor den juvenilen Diabetikern mit 4,2 µg/d.

Die Ergebnisse sind in Tab. 20 und 21 sowie in Abb. 12 zur Übersicht dargestellt (S. 58, 59 und 60).

2.1.6. Zusammenfassung der Ergebnisse:

Propanol liefert für die am Anfang der Arbeit aufgestellte Hypothese, daß die aufgeführten Alkohole bei Diabetikern in Abhängigkeit von der Schwere der diabetischen Stoffwechselsituation vermehrt ausgeschieden werden, das positivste Ergebnis. Es wird bei insulinpflichtigen Diabetikern hochsignifikant und bei diätetisch einstellbaren Diabetikern signifikant vermehrt ausgeschieden.

Darüber hinaus läßt sich vor allem bei den juvenilen, aber auch bei den oral einstellbaren Diabetikern eine vermehrte Ausscheidung feststellen, die sich statistisch jedoch nicht objektivieren läßt. Bei den juvenilen Diabetikern spielt dabei sehr wahrscheinlich eine Rolle, daß die Anzahl der untersuchten Proben im Vergleich zu den anderen Diabetikergruppen fast um die Hälfte geringer war. Mit einem größeren Patientenkollektiv an juvenilen Diabetikern ist zu erwarten, daß sich auch hier ein statistisch signifikantes Ergebnis abzeichnet.

Butanol entspricht nach dem Propanol am zweitbesten dem erwarteten Ergebnis. Es ist bei den insulinpflichtigen Diabetikern statistisch signifikant erhöht im Urin zu finden. Auch bei allen anderen Diabetikergruppen wird es vermehrt ausgeschieden, man erhält jedoch kein signifikantes Ergebnis. Nach bloßer Bereichskorrektur scheiden die oral eingestellten Diabetiker vor den diätetischen und juvenilen Diabetikern am meisten Butanol aus.
Bei Betrachtung des prozentualen Anteils derjenigen Probanden, die überhaupt Butanol im Urin ausscheiden, ergibt sich die gleiche Reihenfolge.

Beim Äthanol liegen die juvenilen Diabetiker mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit von 95 % in ihrer Ausscheidungsrate vor den Normalpatienten. Nach Bereichskorrektur, anhand der Verteilung des Datenmaterials, scheiden die diätetisch einstellbaren Diabetiker vermehrt Äthanol aus. Nach Durchführung des Ausreißertests nach NALIMOV zeichnet sich eine statistisch nicht verfizierbare erhöhte Ausscheidung bei den insulinpflichtigen Diabetikern ab.

Beim Isoamylalkohol findet man in bezug auf die mittleren Ausscheidungsmengen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Diabetikern und Normalpatienten.

Isobutanol liefert wie Isoamylalkohol keine signifikanten Ergebnisse.

Bei Isoamylalkohol und Isobutanol ist jedoch ebenfalls nach einfacher Bereichskorrektur bei fast allen Diabetikergruppen eine erhöhte Ausscheidung abzusehen.

Abb. 13 und Abb. 14 zeigen eine zusammenfassende Übersicht der Ergebnisse (S. 61 und 62).

2.2. Ergebnisse von den Diabetikergruppen aus betrachtet:

2.2.1. Insulinpflichtige Diabetiker:

Die insulinpflichtigen Diabetiker zeigen ein Ergebnis auf, das den anfänglich geäußerten Erwartungen entspricht. Die Ausscheidung von Propanol und Butanol im Urin ist gegenüber derjenigen bei den "Normalpatienten" hochsignifikant erhöht, die der übrigen Alkohole wenigstens andeutungsweise.

2.2.2. Diätetisch einstellbare Diabetiker:

Bei den diätetisch einstellbaren Diabetikern ist das Ergebnis beim Propanol ebenfalls signifikant. Die anderen Alkohole sind ebenfalls erhöht, aber nicht statistisch objektivierbar.

2.2.3. Juvenile Diabetiker:

Das Ergebnis bei den juvenilen Diabetikern entspricht nicht den Erwartungen. Nur die Äthanolausscheidung ist gegenüber den "Normalpatienten" wahrscheinlich (P = 95 %) erhöht. Die übrigen Alkohole sind nur andeutungsweise vermehrt.

2.2.4. Oral einstellbare Diabetiker:

Bei den oral einstellbaren Diabetikern findet man die Alkohole Propanol, Butanol und Isoamylalkohol andeutungsweise erhöht.

2.2.5. Alle Diabetiker zusammengefaßt:

In der Gruppe V findet man keine statistisch objektivierbaren Ergebnisse.

2.2.6. Zusammenfassung:

Bei allen Diabetikergruppen ist die Ausscheidung der Alkohole erhöht. Es zeichnet sich dabei folgende Reihenfolge ab:

Insulinpflichtige (Juvenile) > Diätetisch einstellbare > Oral einstellbare Diabetiker

Die juvenilen Diabetiker wurden ausgeklammert, da der Verfasser vermutet, daß bei dieser Diabetikergruppe lediglich durch die zu geringe Probandenzahl kein statistisch signifikantes Ergebnis gefunden werden konnte.

Nach Ausklammerung der juvenilen Diabetiker zeichnet sich eine Abhängigkeit der Alkoholausscheidungsmenge der einzelnen Alkohole von der Schwere der diabetischen Stoffwechsellage ab.

Die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten Alkoholausscheidung innerhalb der einzelnen Diabetikergruppen zeigt Abb. 15 (S. 62).

2.3. Zusammenhänge mit anderen Parametern:

Da sich auch Zusammenhänge zwischen Alkoholausscheidung und anderen Parametern, die die diabetische Stoffwechselsituation entweder begünstigen, deren Dauer charakterisieren oder in der Klinik dazu herangezogen werden, um ihren Schweregrad zu kennzeichnen, ergeben könnten, wurden zusätzlich folgende Diagnosen, Patientendaten und Laboruntersuchungen berücksichtigt:

a) Diabetische Folgeerkrankungen:

aa) spezifisch diabetische Gefäßveränderungen:
- Mikroangiopathie
- Makroangiopathie

ab) diabetische Polyneuropathie

ac) diabetische Nephropathie:
- Kimmelstiel-Wilson
- Pyelonephritis

b) Insulindosis, -spiegel, C-Peptid

c) Übergewicht

d) Blutzuckertagesprofil

Ad a) Diabetiker, in deren Krankenblatt die Diagnose einer der genannten diabetischen Folgeerkrankungen verzeichnet war, wurden zu einer Gruppe zusammengefaßt.

Im Vergleich zu den "Normalpatienten" ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Propanolausscheidung ($\bar{x}$ = 45,1 gegenüber 28,3) deutlich erhöht.
- Butanol ($\bar{x}$ = 8,4 gegenüber 0,5) deutlich erhöht.
- Isoamylalkohol ($\bar{x}$ = 8,3 gegenüber 0,8) deutlich erhöht.

Übersicht in Tab. 13, 15, 17, 19 und 21.

Ad b) Um Zusammenhänge zwischen Alkoholausscheidung einerseits und Insulindosis, -spiegel und C-Peptid andererseits zu ermitteln, wurde bei allen Probanden die Regression dieser Parameter gegen die Propanolausscheidung ermittelt. Propanol wurde deshalb als Repräsentant für die anderen Alkohole gewählt, weil bei diesem die Abhängigkeit der Ausscheidungsmenge von der Schwere der diabetischen Stoffwechselsituation am deutlichsten war. Es konnte jedoch keine positive Korrelation ermittelt werden.

Ad c) Ein Übergewicht der Patienten wurde in prozentualer Abweichung vom Idealgewicht (≙ bei Frauen: BROCA - 15 %, bei Männern: BROCA - 10 %) ermittelt. Die Regression dieses Parameters gegen diejenige der Äthanolausscheidung ergab keine Abhängigkeit.

Ad d) Das Blutzuckertagesprofil kennzeichnet am einfachsten und besten die Schwere der diabetischen Stoffwechselsituation. Es schien daher sinnvoll, die Alkoholausscheidung mit den Tagesblutzuckerspitzen in Beziehung zu setzen. Hierzu wurden die Patienten in eine Gruppe eingeteilt, in der die Blutzuckertagesmaxima unter 200 mg/100 ml Blut betrugen und in eine, in der sie über diesem Wert lagen.

Bei Vergleich der Alkoholausscheidungsmengen innerhalb dieser beiden Gruppen ergab sich für Isobutanol und Isoamylalkohol eine vermehrte Ausscheidung.

Die Ergebnisse sind in Tab. 13, 15, 17, 19 und 21 dargestellt.

Zusammenfassend erhält man also bei Diabetikern mit diabetischen Folgeerkrankungen und bei Patienten mit hohen BZ-Tagesprofilspitzen als Ausdruck der Zeitdauer und der Schwere der diabetischen Stoffwechsellage eine erhöhte Ausscheidung der verschiedenen Alkohole im Urin.

2.4. Heptanon-4-Bestimmung:

Die Ergebnisse bei der H-4-Bestimmung zeigten im wesentlichen die gleichen Ergebnisse auf wie bei der Bestimmung der Alkohole im Urin.

Die H-4-Ausscheidung der insulinpflichtigen Diabetiker mit $\bar{x}$ = 1943 mg/d ist gegenüber derjenigen der "Normalpatienten" $\bar{x}$ = 918 deutlich erhöht.

Die juvenilen Diabetiker $\bar{x}$ = 1829 mg/d scheiden in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei den Alkoholen weniger aus als die insulinpflichtigen. In der 1978 veröffentlichten Arbeit über das Verhalten des H-4 im Urin bei Diabetikern, war jedoch die Ausscheidung bei den juvenilen Diabetikern höher als bei den insulinpflichtigen (3).

Dieser Sachverhalt spricht ebenfalls für die in 2.2.5. geäußerte Vermutung, daß das Ergebnis bei den juvenilen Diabetikern durch die zu geringe Probandenzahl nicht repräsentativ ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG:

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von 1500 massenfragmentographischen Analysen aufgezeigt, daß bei Diabetikern die Ausscheidung von Äthanol, Propanol, Isobutanol, Butanol und Isoamylalkohol im Urin gegenüber Normalpatienten zum Teil signifikant erhöht ist. Besonders deutlich war dieses Ergebnis bei Propanol, Butanol und Äthanol.

Weiterhin konnte unter Einbeziehung weiterer klinischer Daten und Laboruntersuchungen, wie die Diagnose diabetogener Folgeerkrankungen, des Blutzuckertagesprofils, des Übergewichts, der Insulindosis, des Insulinspiegels und des C-Peptids, aufgezeigt werden, daß die Ausscheidung der genannten Alkohole abhängig von der Schwere der diabetischen Stoffwechselstörung ist. Hierbei ergab sich folgende Reihenfolge:

juvenile > insulinpflichtige > diätetisch > oral einstellbare Diabetiker.

Eine Abhängigkeit vom Übergewicht, von der Insulindosis, dem Insulinspiegel und dem C-Peptid konnte nicht aufgezeigt werden.

Das hierbei verwendete Verfahren der Massenfragmentographie hat sich dabei durch seine ausgezeichnete Spezifität, seine sehr große Nachweisempfindlichkeit im pg-Bereich und seine Praktikabilität bewährt.

Unter Verwendung von internen Standards wurden die meisten Fehlermöglichkeiten mit großer Sicherheit ausgeschlossen. Die Präzisionskontrolle ergab einen Variationskoeffizienten von unter 10 %.

Die Direkteinspritzung des Urins bei der Äthanolbestimmung, die durch Verwendung eines speziellen Ventilsystems für das Beseitigen des Wasserdampfes aus der GC-Säule ermöglicht wurde, ersparte ein aufwendiges Extraktionsverfahren.

F. Tabellen und Histogramme:

Alkohol: Äthanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diabetiker
$\bar{X}$	3,15	4,6	3,0	2,24	6,15	2,3
Standardabweichung	2,78	5,0	3,22	1,75	6,33	2,1
Probandenanzahl	62	72	60	68	37	237
Anteil der Ausreißer in %	32,25	22,2	25	41,17	35,13	40,1
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	98,5	80,3	85	90,2	97,5	87
Signifikanz des Unterschiedes zu Normalpat.		0	0	0	95 %	0

Tabelle 12:

Äthanolausscheidung/d in mg

Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert (für P = 99 %). Signifikanz des Unterschiedes der jeweiligen Diabetikergruppe zu Normalpatienten mit t-Test ermittelt.

Alkohol: Äthanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diab.	m. diab. Kompl.	BZ max. < 200	BZ max. > 200
$\bar{X}$	10,5	9,3	6,0	12,2	14,5	10,1	12,0	5,8	5,3
Standardabweichung	14,7	14,0	11,0	16,9	20,3	15,5			
Probandenanzahl	62	72	60	68	37	237			
Anteil der Ausreißer in %	8,0	9,7	16,7	4,4	21,6	11,8			
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	98,5	80,3	85,0	90,2	97,5	87,0			

Tabelle 13:

Äthanolausscheidung/d in mg

Bereich wurde grob anhand der Verteilungskurven korrigiert.

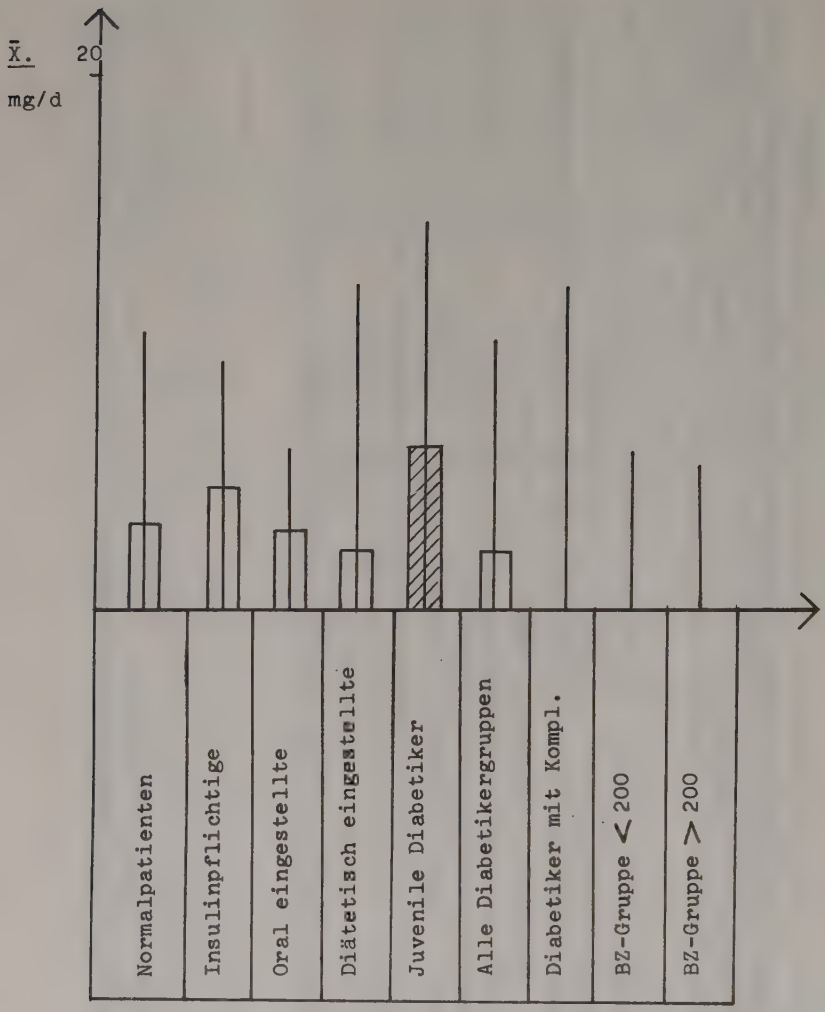


Abb. 8:

Alkohol: Äthanol

mittlere Ausscheidungsmenge/d, Standardabweichung

| Ausreißer wurden grob anhand der Verteilungskurve eliminiert.

Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert.

Unterschied zu Normalpatienten statistisch wahrscheinlich (P = 95 %).

Alkohol: Propanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diabetiker
$\bar{X}$	0	34,2	0	5,4	0	0
Standardabweichung	0	36,9	0	8,2	0	0
Probandenanzahl	62	68	63	67	37	107
Anteil der Ausreißer in %	38,7	13,2	46,0	37,3	56,8	54,5
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	38,1	62,5	46,1	51,5	57,9	54,4
Signifikanz des Unterschiedes zu Normalpat.		99,9 %	0	99 %	0	0

Tabelle 14:
Propanolausscheidung/d in µg
Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert (für P = 99 %).
Signifikanz des Unterschiedes der jeweiligen Diabetikergruppe zu Normalpatienten mit t-Test ermittelt.

Alkohol: Propanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diab.	m. diab. Kompl.	BZ max. < 200	BZ max. >200
$\bar{X}$	29,1	40,0	38,7	34,0	38,2	37,6	45,1	16,7	16,9
Standardabweichung	62,4	44,3	63,3	54,7	61,9	55,3			
Probandenanzahl	62	68	63	67	37	235			
Anteil der Ausreißer in %	8,1	8,8	7,9	7,5	10,8	8,5			
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	38,1	62,5	46,1	51,5	57,9	54,4			

Tabelle 15:

Propanolausscheidung/d in µg

Bereich wurde grob anhand der Verteilungskurven korrigiert.

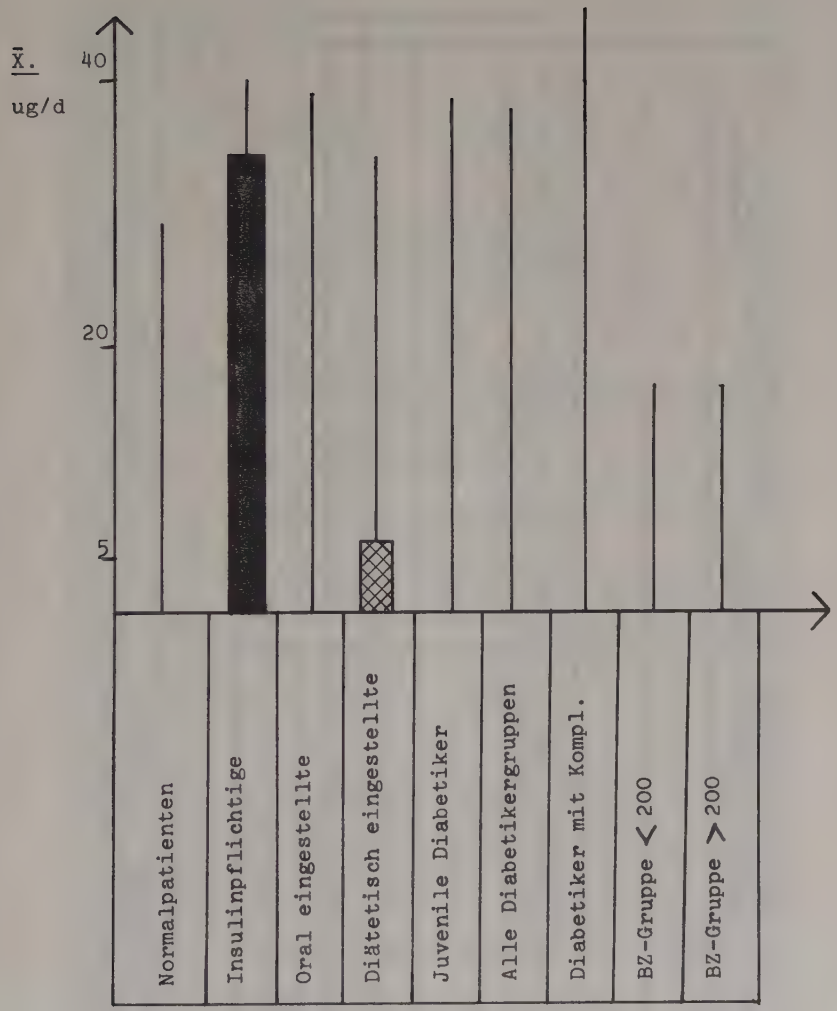


Abb. 9: Propanol

Alkohol:

mittlere Ausscheidungsmenge/d, Standardabweichung

Ausreißer wurden grob anhand der Verteilungskurve eliminiert.

Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert.

Hochsignifikanter Unterschied zu Normalpatienten (P = 99,9 %).

Signifikanter Unterschied zu Normalpatienten (P = 99 %).

Alkohol: Isobutanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diabetiker
$\bar{X}$	0	0	0	0	0	0
Standardabweichung	0	0	0	0	0	0
Probandenanzahl	62	69	64	67	37	237
Anteil der Ausreißer in %	0	10,1	1	10,5	5,4	7,2
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	0	9,6	1,6	10,0	5,3	7,0
Signifikanz des Unterschiedes zu Normalpat.		0	0	0	0	0

Tabelle 16:
Isobutanolausscheidung/d in µg
Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert (für P = 99 %),
Signifikanz des Unterschiedes der jeweiligen Diabetikergruppe zu Normalpatienten mit t-Test ermittelt.

Alkohol: Isobutanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diab.	m. diab. Kompl.	BZ max. < 200	BZ max. > 200
$\bar{X}$	0	2,2	0	3,3	2,7	2,2	1	0,9	2,65
Standardabweichung	0	5,2	0	8,9	7,3	6,2			
Probandenanzahl	62	69	64	67	37	237			
Anteil der Ausreißer in %	0	4,4	1,5	3,0	0	2,5			
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	0	9,6	1,5	10,0	5,3	32,8			

Tabelle 17:

Isobutanolausscheidung/d in µg

Bereich wurde grob anhand der Verteilungskurven korrigiert.

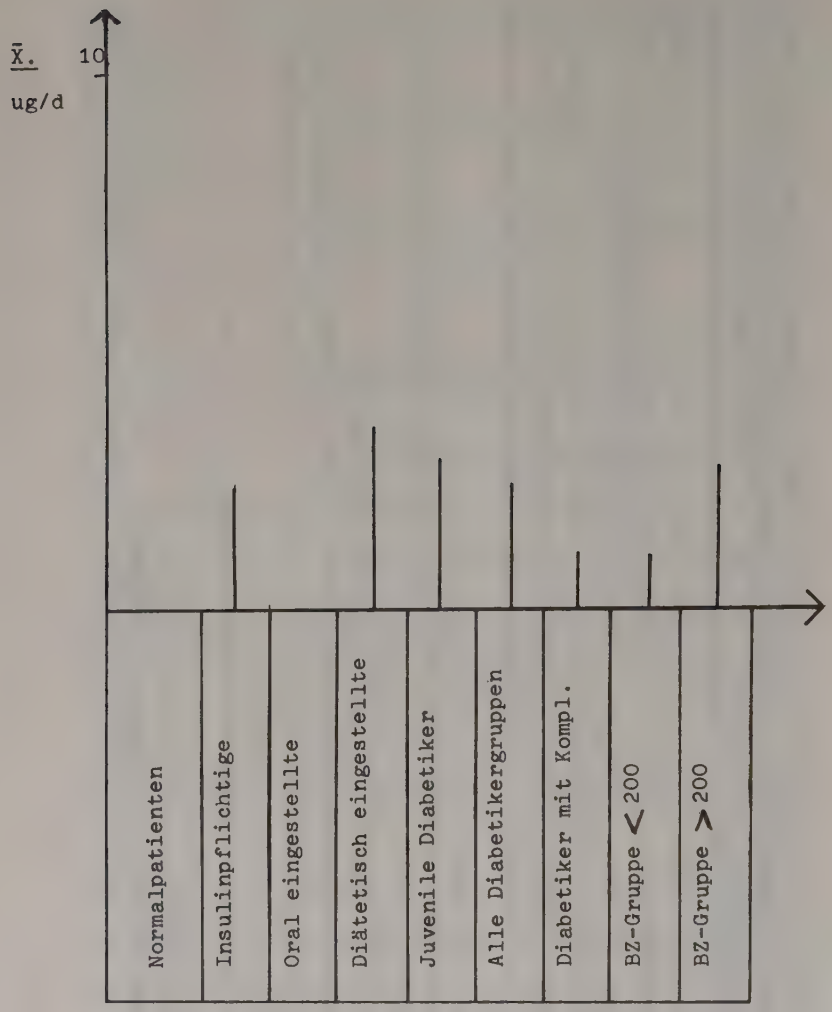


Abb. 10:

Alkohol: Isobutanol
mittlere Ausscheidungsmenge/d, Standardabweichung.

| Ausreißer wurden grob anhand der Verteilungskurve eliminiert.

Alkohol: Butanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diabetiker
$\bar{X}$	0	8,7	0	0	0	0
Standardabweichung	0	11,7	0	0	0	0
Probandenanzahl	62	69	63	67	37	236
Anteil der Ausreißer in %	3,2	17,4	35,0	28,4	18,9	33,5
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	3,2	42,5	35,0	28,6	18,5	32,8
Signifikanz des Unterschiedes zu Normalpat.		99,9	0	0	0	0

Tabelle 18:
Butanolausscheidung in µg/d
Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert (für P = 99 %),
Signifikanz des Unterschiedes der jeweiligen Diabetikergruppe zu Normalpatienten mit t-Test ermittelt.

Alkohol: Butanol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diab.	m. diab. Kompl.	BZ max. < 200	BZ max. > 200
$\bar{X}$	1,46	11,2	8,0	6,7	3,5	7,8	8,4	6,7	5,85
Standardabweichung	3,3	14,7	12,9	12,2	8,1	12,8			
Probandenanzahl	62	69	63	67	37	237			
Anteil der Ausreißer in %	0	11,6	11,1	9,0	8,1	10,5			
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	3,2	42,5	35,0	28,6	18,5	32,8			

Tabelle 19:

Butanolausscheidung/d in µg

Bereich wurde grob anhand der Verteilungskurve korrigiert.

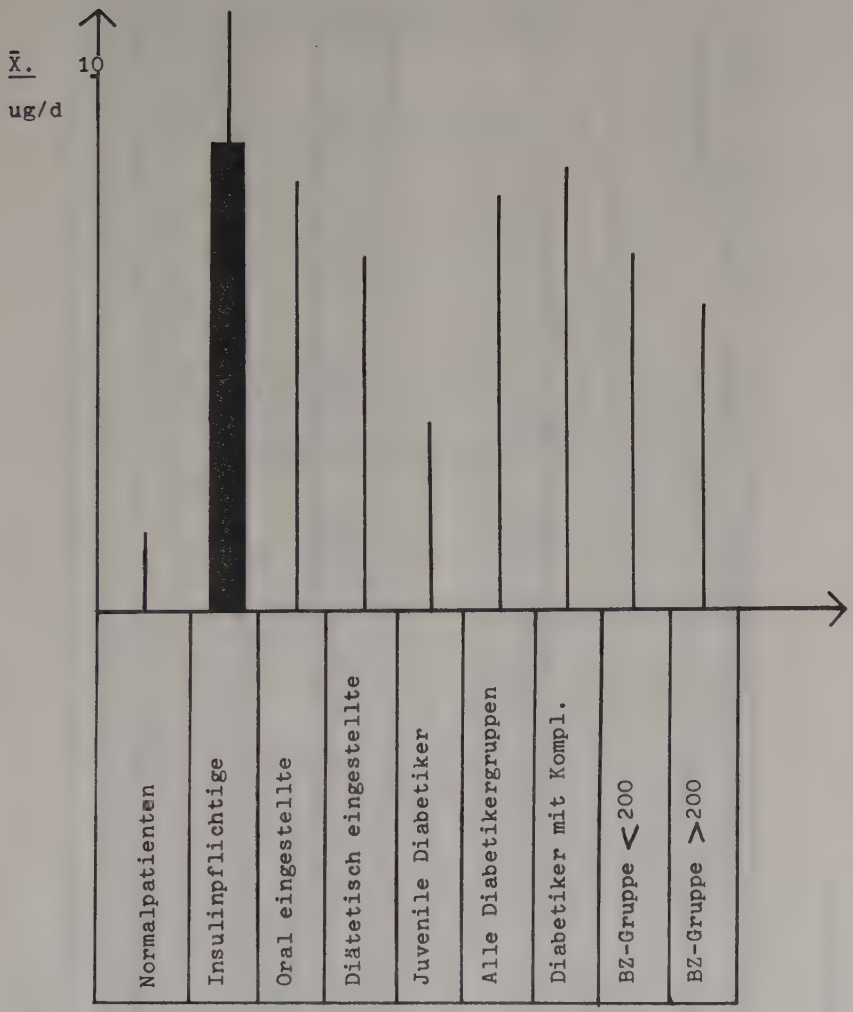


Abb. 11:

Alkohol: Butanol
mittlere Ausscheidungsmenge/d, Standardabweichung

Ausreißer wurden grob anhand der Verteilungskurve eliminiert.

Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert.

Unterschied zu Normalpatienten statistisch hochsignifikant.

Alkohol: Isoamylalkohol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diabetiker
$\bar{X}$	0	0	0	0	0	0
Standardabweichung	0	0	0	0	0	0
Probandenanzahl	62	68	64	67	37	236
Anteil der Ausreißer in %	8,1	29,4	23,4	17,9	16,2	22,4
Anteil der Probanden mit Alkohol in %	8,0	29,4	23,4	17,9	16,2	22,4
Signifikanz des Unterschiedes zu Normalpat.		0	0	0	0	0

Tabelle 20:
Isoamylalkoholausscheidung/d in µg
Ausreißer wurden mit dem Ausreißertest nach NALIMOV eliminiert (für P = 99 %),
Signifikanz des Unterschiedes der jeweiligen Diabetikergruppe zu Normalpatienten mit t-Test ermittelt.

Alkohol: Isoamylalkohol

	Normal-pat.	Insulin-pfl.	Oral eingest.	Diätet.	Juven.	alle Diab.	m. diab. Kompl.	BZ max. < 200	BZ max. > 200
$\bar{X}$	1,7	12,5	6,1	6,5	4,2	7,7	8,3	5,4	9,8
Standardabweichung	2,9	23,1	14,8	15,2	10,1	17,2			
Probandenanzahl	62	68	64	67	37	236			
Anteil der Ausreißer in %	1,6	8,8	7,8	4,5	0	16,0			
Anteil der Prob. mit Alkohol in %	8,0	29,2	23,5	17,2	15,8	22,2			

Tabelle 21:

Isoamylalkoholausscheidung/d in µg

Bereich wurde grob anhand der Verteilungskurven korrigiert.

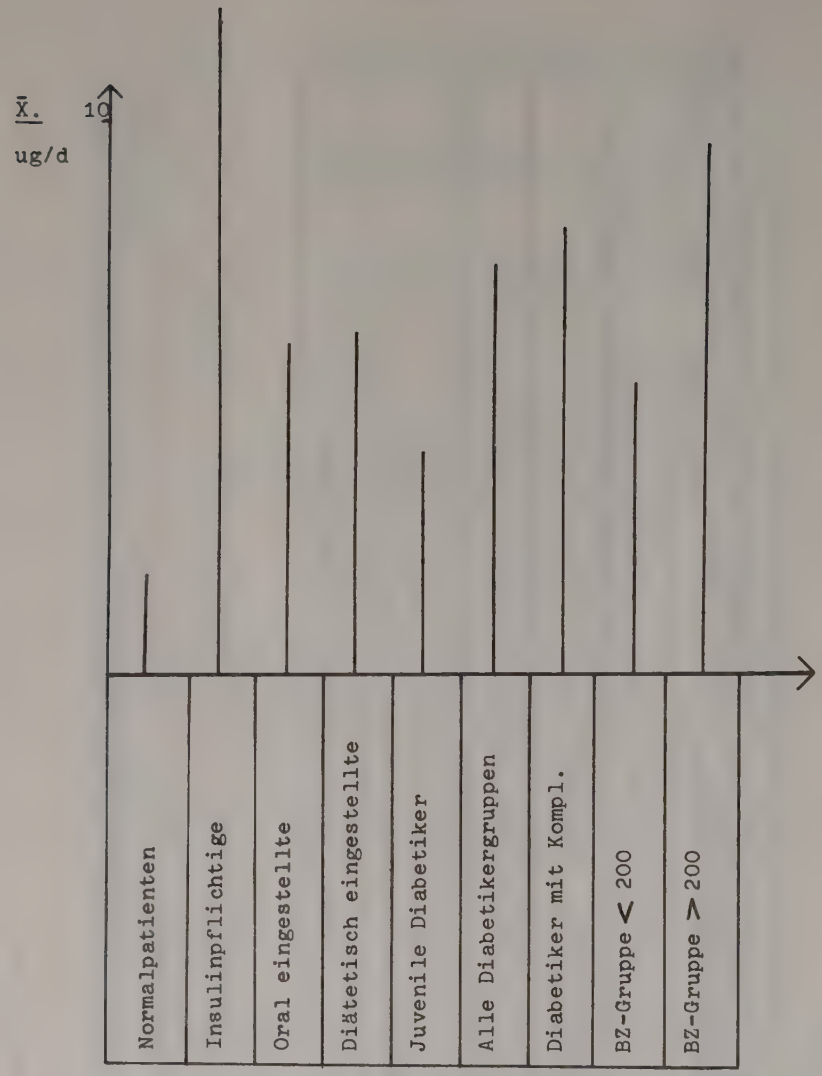


Abb. 12:

Alkohol: Isoamylalkohol
mittlere Ausscheidungsmenge/d, Standardabweichung

Ausreißer wurden grob anhand der Verteilungskurve eliminiert.

	Normalpat.		Insul.-pfl.		Oral eingest.		Diätetische		Juvenile		Alle Diab.	
	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y	x	y
U-Äthanol in mg/d	3,2	10,5	4,6	9,3	3,0	6,0	2,2	12,2	6,2	14,5	2,3	10,1
U-Propanol in ug/d	0,0	29,1	34,2	40,6	0,0	38,7	5,4	34,0	0,0	38,2	0,0	37,6
U-Isobutanol in ug/d	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	2,7	0,0	2,2
U-Butanol in ug/d	0,0	1,5	8,7	11,2	0,0	8,0	0,0	6,7	0,0	3,5	0,0	7,8
U-Isoamylalkohol in ug/d	0,0	1,7	0,0	12,5	0,0	6,1	0,0	6,5	0,0	4,2	0,0	7,7

Abb. 13:

Zusammenfassung der Ergebnisse in einer Übersicht:

x: $\bar{x}$ nach NALIMOV-Ausreißertest

y: $\bar{x}$ nach Meßbereichskorrektur anhand der Verteilung des Datenmaterials

: Ausscheidung erhöht, jedoch nicht statistisch objektivierbar

: Ausscheidung statistisch wahrscheinlich)

: Ausscheidung statistisch signifikant (P = 99 %) erhöht

: Ausscheidung statistisch hochsignifikant (P = 99,9 % erhöht

	▨	▢	□	■
Äthanol	2	1		
Propanol	3		1	1
Isobutanol	4			
Butanol	4			1
Isoamylalkohol	5			

Abb. 14:

Darstellung der Anzahl und der Wahrscheinlichkeit der Ergebnisse für die einzelnen Alkohole.

▨ : Ausscheidung erhöht, jedoch nicht statistisch objektivierbar.
▢ : Ausscheidung wahrscheinlich erhöht (P = 95 %).
□ : Ausscheidung signifikant erhöht (P = 99 %).
■ : Ausscheidung hochsignifikant erhöht (P = 99,9 %).

	▨	▢	□	■
Insulinpfl. Diab.	3			2
Oral eingest. "	3			
Diätetische "	4		1	
Juvenile "	4	1		

Abb. 15:

Darstellung der Anzahl und der Wahrscheinlichkeit der Ergebnisse für die einzelnen Diabetikergruppen.

▨ : Ausscheidung erhöht jedoch nicht statistisch objektivierbar.
▢ : Ausscheidung wahrscheinlich erhöht (P = 95 %).
□ : Ausscheidung signifikant erhöht (P = 99 %).
■ : Ausscheidung hochsignifikant erhöht (P = 99,9 %).

G. LITERATURVERZEICHNIS:

1) Budzikiewicz, H.: Massenspektrometrie, 1. Auflage, Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie GmbH (1972).

2) Gross, R., P. Schölmerich: Lehrbuch der Inneren Medizin, 5. Auflage, Stuttgart: Schattauer (1977).

3) Huesgen, G.: Die Quantitative Bestimmung von Heptanon-4 und Heptanon-2 im Urin bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Diabetes mellitus, Dissertation Tübingen 1978.

4) Kaiser, R., G. Gottschalk: Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten, Mannheim: Bibliographisches Institut 1972.

5) Liebich, H. M.: Massenspektrometrie und kombinierte Techniken in Medizin, klinischer Chemie und klinischer Biochemie.
J. Clin. Chem., Clin. Biochem., 16, 677 - 686 (1978).

6) Liebich, H. M., O. Al Babbilli: Gas Chromatographik-Mass-Spektrometric Study of Volatile Organic Metabolites in Urines of Patients with Diabets Mellitus.
J. of Chromatography, 112, 539 - 550 (1975).

7) Liebich, H. M., G. Huesgen: Rapid Quantitative Microanalysis of Ketones in Urine by Gaschromatography-Mass Fragmentography. Journal of Chromatography 126, 465 - 474 (1976).

8) Liebich, H. M., J. Wöll: Volatile Substances in Blood Serum: Profile Analysis and Quantitative Dertermination.
Journal of Chromatography 142, 505 - 516 (1977).

9) Lyons, H., J. Bard: Gas Chromatographic Determintation of Lower Alcohols in Biologic Samples.
Clinical Chemestry, 5, 429 - 432 (1964).

10) Mather, A., A. Assimos: Evaluation of Gas-Liquid Chromatography in Assays for Blood Volatiles.
Clinical Chemestry, 11, 1023 - 1035 (1965).

11) Mittmeyer, H.-J.: In vitro Untersuchungen über die Veränderungen Alkoholgehaltes länger gelagerter Rinderblutproben.
Blutalkohol, 9, 98 - 103 (1972).

12) Sweeley, Cc., W. H. Elliot, J. Fries and R. Ryhage: Mass Spectrometrie Determination of Unresolved Components in Gas Chromatographic Effluents. Anal. Chem., 38, 1549 (1966).

13) Seibel, J.: Massenspektrometrie, 1. Auflage, Frankfurt am Main: Akademische Verlagsgesellschaft (1970).

L E B E N S L A U F

AM 14.01 1954 WURDE ICH, HANS-JOACHIM BÜLOW, ALS SOHN DES ARZTES DR. HANS ARNIM BÜLOW UND SEINER EHEFRAU DR. MED. GERDA BÜLOW, GEBORENE LANG, IN BREMEN GEBOREN.
BESUCH DER GRUNDSCHULE VON 1960 BIS 1964 IN KARLSRUHE.
AB 1964 BESUCH DES HUMANISTISCHEN BISMARCK-GYMNASIUMS IN KARLSRUHE.
ABITUR 1973.
IM OKTOBER 1973 EINBERUFUNG ZUM GRUNDWEHRDIENST.
BEGINN DES MEDIZINSTUDIUMS IM OKTOBER 1974 ALS SANITÄTSOFFIZIERANWÄRTER DER BUNDESWEHR.
IM AUGUST 1976 PHYSIKUM.
1977 UND 1979 JEWEILS IM AUGUST ABLEGUNG DES ERSTEN UND ZWEITEN TEILS DER ÄRZTLICHEN PRÜFUNG.
ABSCHLUSS DES STUDIUMS MIT DEM DRITTEN TEIL DER ÄRZTLICHEN PRÜFUNG AM 22. OKTOBER 1980
AN DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN.